UNIVERSITE DE RENNES
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
ANNEE 1965 — N° ~~187/AM~~ 22

STEREOISOMERISATION ARTIFICIELLE DANS LA SERIE DES CAROTENOIDES ISOMERIE « CIS-TRANS » DE L'ASTAXANTHINE : EFFETS DES RADIATIONS

Travail du Service de Biochimie Médicale
(Professeur R. GRANGAUD)

THÈSE

pour le Doctorat d'Etat de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement le 9 Mars 1965

par

M^me^ CHARDENOT née MAMAN Paulette

Assistant des Facultés
de Médecine et de Pharmacie
Chargée de Cours à la Faculté d'Alger

PRÉSIDENT DE THÈSE : Monsieur le Professeur GRANGAUD

MEMBRES DU JURY : Monsieur le Professeur TIOLLAIS
Monsieur le Professeur GUELFI
Monsieur le Docteur NICOL
Maître de Conférences-Agrégé

UNIVERSITE DE RENNES
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
ANNEE 1965 — N° 187/AM

STEREOISOMERISATION ARTIFICIELLE DANS LA SERIE DES CAROTENOIDES ISOMERIE « CIS-TRANS » DE L'ASTAXANTHINE : EFFETS DES RADIATIONS

Travail du Service de Biochimie Médicale
(Professeur R. GRANGAUD)

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

THÈSE

pour le Doctorat d'Etat de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement le 9 Mars 1965

par

M^me^ CHARDENOT née MAMAN Paulette

Assistant des Facultés
de Médecine et de Pharmacie
Chargée de Cours à la Faculté d'Alger

PRÉSIDENT DE THÈSE : Monsieur le Professeur GRANGAUD

MEMBRES DU JURY : Monsieur le Professeur TIOLLAIS
Monsieur le Professeur GUELFI
Monsieur le Docteur NICOL
Maître de Conférences-Agrégé

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544722_0023

PROFESSEURS

MM.	LEROY, Doyen	Clinique des Maladies infectieuses
	TIOLLAIS, Assesseur du Doyen	Chimie Pharmaceutique
	ARDOUIN	Clinique Ophtalmologique
	BOUREL	Clinique Médicale A
	N	Clinique Médicale B
	BOURGUET	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
	CHAMBON	Histologie et Embryologie
	CHAUVEL	Chimie Analytique
Mme	CHEVREL	Anatomie Pathologique
MM.	CORMIER	Matière Médicale
	COUTEL	Bactériologie et Hygiène
	DESCUNS	A titre personnel
	DOBY	Parasitologie et Zoologie Appliquée
	GRANGAUD	Biochimie Médicale
	GREGOIRE	Pharmacie Galénique
	GUELFI	Biophysique Médicale
	GUIHENEUC	Clinique Chirurgicale A
	N	Anatomie
	HUGUENIN	A titre personnel
	JACQUEMIN	A titre personnel
	LE GAC	Biochimie Appliquée
	LE GUYON	Biologie Expérimentale
	MARUELLE	Pathologie Chirurgicale
	MICHAUX	A titre personnel
	PATAY	Physiologie
	PECKER	Clinique Neuro-Chirurgicale
	PELLE Abel	Clinique Chirurgicale B
	SAMBRON	Pathologie Générale et Interne
	SENECAL	A titre personnel
	TOULOUSE	Clinique Obstétricale
	VIVIEN	Thérapeutique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.	LANCHOU	Anatomie
	PAULET	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

MM.	BRICOUT	Bactériologie
	CATROS	Ophtalmologie
	DANRIGAL	Pneumo-Phtisiologie
	DESGREZ	Physique Médicale
	DUBOIS	Obstétrique
	DUHAMEL	Chirurgie Générale
	FERRAND Bernard	Anatomie Pathologique
	GASTARD	Thérapeutique
	GOUFFAULT	Médecine Générale
	HUET	Chimie Organique
	JAVALET	Neuro-Chirurgie
	JEZEQUEL	Pédiatrie et Puériculture
	JOUAN	Chimie Biologique et Pharmaceutique
	LEBORGNE	Hydrologie
	LE MENN	Médecine Générale et Thérapeutique
	LENOIR	Médecine Générale et Thérapeutique
	LIMBOUR	Oto-Rhino-Laryngologie
	NICOL	Biochimie Médicale
	N	Pédiatrie
	RICHIER Jean-Laurent	Médecine Générale
	RIVIERE	Histologie et Embryologie
	SABOURAUD	Médecine Générale
	SOURNIA	Chirurgie Générale
	TREBAUL	Pharmacodynamie
	VAN DEN DRIESSCHE	Pharmacologie

A MON MARI

A TOUS LES MIENS

A MONSIEUR LE RECTEUR GAUTHIER

Recteur de l'Académie de Besançon

Doyen Honoraire de la Faculté

des Sciences de Lyon

Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage de ma gratitude et de mon profond respect.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GRANGAUD

Professeur de Biochimie Médicale

Assesseur du Doyen

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui, depuis dix ans, nous honore de sa confiance. Il a inspiré le sujet de ce travail et en a rendu la réalisation possible par une aide constante.

Nous n'oublierons jamais la bienveillance avec laquelle il nous a toujours guidée et combien nous ont été précieux, en des circonstances difficiles, ses encouragements : c'est pour nous une joie profonde d'avoir pu maintenir dans la chaire qui fut sienne l'esprit d'équipe et de sereine amitié, qu'il avait su y insuffler.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre respecteux attachement.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR TIOLLAIS

Professeur de Chimie Pharmaceutique
Assesseur du Doyen
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUELFI

Professeur de Biophysique Médicale
Chevalier de la Légion d'Honneur

Très sensible à l'honneur qu'ils ont bien voulu nous faire en acceptant de juger de ce travail, nous les prions de recevoir l'expression respectueuse de notre reconnaissance.

MONSIEUR LE DOCTEUR NICOL

Maître de Conférences-Agrégé
de Biochimie Médicale

Nous ne saurions assez dire combien nous sommes sensible aux marques d'intérêt, de sollicitude et de sympathie qu'il nous a toujours témoignées.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de nos plus sincères remerciements.

A NOS MAITRES

de la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie
et de la Faculté des Sciences d'Alger

Hommage respectueux

A André SOUSSY, Docteur d'Etat en Pharmacie,

et au Docteur Claude SUAUDEAU,

pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée dans l'élaboration de ce travail.

Nous leur exprimons nos plus vifs remerciements, et les assurons de notre fidèle amitié.

A NOS CAMARADES

des Laboratoires de Biochimie Médicale d'Alger et de Rennes

En amical souvenir.

PREFACE

« C'est pour avoir contemplé avec une géniale patience d'infimes facettes cristallines que PASTEUR a transformé la Médecine ».

(L.C. MAILLARD)

« L'un des développements les plus marquants de la Science moderne, est que la Biologie a commencé l'investigation de ses problèmes classiques à l'échelle moléculaire ».

(G. WALD)

C'est une notion aujourd'hui classique et singulièrement féconde que la répartition spatiale des atomes ou groupes d'atomes dans les molécules organiques retentit sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques : les problèmes de structure moléculaire et de spécificité stérique des constituants cellulaires s'inscrivent en effet parmi les plus fondamentaux de la Biochimie moderne.

La présence constante de plusieurs doubles liaisons conjuguées dans la molécule des pigments caroténoïdes laisse prévoir la possibilté de nombreuses formes stéréoïsomères (*). Ces pigments, si largement répandus dans la nature, aussi bien chez les animaux que chez les végétaux, se présentent le plus souvent sous la variété entièrement « trans » *(1)*.

Cependant, l'existence d'isomères naturels « mono » et « polycis » a été démontrée dans le cas de la crocétine *(2)*, des carotènes *(3)* et du lycopène *(4)*, et, l'on sait préparer artificiellement ces mêmes stéréoisomères ainsi que beaucoup d'autres par divers procédés tels que l'action de l'iode (*(5)* p. 38) de la lumière *(6)*, de la chaleur *(7)* ou l'absorption du pigment sur oxydes métalliques *(8)* *(9)*.

Dans certains cas au moins, la configuration de ces dérivés «mono» et «poly-cis» naturels ou artificiels, a pu être pré-

---

(*) στερέος = solide

cisée, la majeure partie des connaissances acquises dans cette branche de la stéréochimie étant due à ZECHMEISTER et ses collaborateurs *(10)* ainsi qu'à WALD *(11)*.

En 1956, il nous a été donné de rassembler en un mémoire *(12)* l'étude de l'isomérie cis-trans de l'astaxanthine dont nous avions pu démontrer avec R. GRANGAUD *(13)* que ce pigment se comportait à cet égard comme ceux des caroténoïdes pour lesquels l'existence de plusieurs formes stéréoisomères naturelles ou artificielles avait déjà été établie. La réalité de ce phénomène avait d'ailleurs été antérieurement soupçonnée : se référant à l'analyse chromatographique et spectrophotométrique, CHECHAN, GRANGAUD et MASSONET *(14)* avaient en effet constaté que ce pigment pouvait se présenter spontanément dans les milieux naturels sous plusieurs formes voisines et ces auteurs avaient émis l'hypothèse qu'il devait s'agir de stéréoisomères.

Notre travail d'ensemble sur les formes stéréoisomères de l'astaxanthine et les agents de stéréoisomérisation a été poursuivi depuis 1956 et trouve son prolongement dans une étude de l'action des radiations sur ce pigment.

L'emploi des rayonnements ionisants qui tend à se répandre de plus en plus pour provoquer des altérations moléculaires n'a pas, à notre connaissance, abouti jusqu'ici à la mise en évidence d'un effet de stéréoisomérisation. Peu nombreuses d'ailleurs, sont les expériences qui ont trait à l'action de ces agents physiques sur les pigments caroténoïdes et il convient surtout de mentionner que les quelques recherches effectuées dans ce sens ont été consignées comme aboutissant, non pas à des modifications de formes stériques des molécules, mais à leur transformation chimique : c'est ainsi que PAN KIA-YIN et BALISTIC signalent qu'ils ont obtenu la formation de vitamine A à partir du β-carotène *(15)*.

Le présent travail a pour objet de rapporter les expériences qui établissent que les radiations sont susceptibles de provoquer l'isomérisation «cis-trans» de l'astaxanthine et de comparer les résultats obtenus avec ceux antérieurement acquis.

Ce travail a été poursuivi dans le laboratoire où avaient débuté nos expériences, c'est-à-dire au laboratoire de Biochi-

mie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie d'Alger : c'est assez souligner qu'en raison des circonstances, les difficultés matérielles ne nous ont pas été épargnées. C'est pour nous une raison supplémentaire de dire notre gratitude à ceux qui, au Centre d'Etudes Nucléaires comme au Centre Anti-Cancéreux et au laboratoire de Biochimie de la Faculté, ne nous ont ménagé, ni conseils, ni aide efficace. Il importe de nommer tout particulièrement les professeurs DUMONTET, BOFFA, BASILE, le docteur BERNADAC et Monsieur ISSAFO.

Mais, en outre, ce travail n'aurait pu être mené à bien sans les encouragements venus du laboratoire de Biochimie Médicale de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Rennes. Chacun de ses membres a suivi son élaboration avec une sollicitude dont nous ne saurions assez dire le réconfort qu'elle nous a apporté.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

ETUDE HISTORIQUE ET CRITIQUE DES TRAVAUX ANTERIEURS.

CHAPITRE I.

Facteurs susceptibles de provoquer l'isomérisation «cis-trans» des caroténoïdes et techniques mises en œuvre.

CHAPITRE II.

Formes «mono et poly-cis» naturelles et artificielles des caroténoïdes.

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE.

CHAPITRE I.

Isomérisation du β-carotène et de l'astaxanthine sous l'action de la chaleur, en fonction du temps et par adsorption sur alumine.

CHAPITRE II.

Action des radiations sur le β-carotène, la xanthophylle et l'astaxanthine.

CHAPITRE III.

Confrontation de l'ensemble des résultats et discussion générale.

RESUME ET CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

En 1923, HERZIG et FALTIS *(16)* ont montré que la bixine décrite pour la première fois et dénommée par BOUSSINGAULT *(17)* se présente sous deux formes isomères. Mais c'est KARRER, HELFENSTEIN, WIDMER et van ITALLIE *(18)* qui, en 1929, ont interprété l'existence de ces deux formes comme un cas d'isomérie «cis-trans». Un fait analogue devait être découvert par KUHN et WINTERSTEIN en 1933 *(2)* dans le safran ; en effet, à côté du pigment principal, la crocétine, existe une petite quantité d'un isomère géométrique de celle-ci : l'isocrocétine.

En 1935, GILLAM et EL RIDI *(8)*, en soumettant à l'adsorption chromatographique une solution homogène de β-carotène, obtinrent un nouveau pigment, le pseudo-α-carotène. Cette transformation, attribuée par GILLAM et EL RIDI à l'action de l'adsorbant lui-même, devait attirer l'attention sur le fait que l'utilisation d'une technique d'analyse, par ailleurs tout à fait remarquable, n'excluait pas le risque de production d'«artefacts» *(19)*. Mais l'interprétation, d'abord admise par GILLAM et EL RIDI, devait être contestée *(20) (21) (7)*, et, c'est seulement depuis 1951 *(9)* qu'il est définitivement établi que l'adsorption chromatographique est suceptible de provoquer l'isomérisation «cis-trans» des caroténoïdes.

Pour un même caroténoïde le nombre théoriquement possible d'isomères «cis-trans» est extrêmement grand. Pour l'α-carotène par exemple dont la molécule n'est pas symétrique et qui possède 9 doubles liaisons dans la chaîne terpénique, ce nombre est 2^9 soit 512. Toutefois, par suite d'inhibitions spatiales, les formes susceptibles d'exister doivent être beaucoup moins nombreuses. Selon ZECHMEISTER, LE ROSEN, WENT et PAULING *(4)*, dans le cas des caroténoïdes, l'isomérisation «cis-trans» n'est possible qu'au niveau des doubles liaisons adjacentes aux groupes méthyles.

L'exemple des isomères du rétinène$_1$ étudiés par HUBBARD et WALD *(22) (23)*, montre cependant que doivent exister des exceptions à cette règle (cf. ci-dessous, Première partie, chapitre II).

L'isomérisation géométrique d'un caroténoïde primitivement sous la forme entièrement «trans», s'accompagne de change-

ments constants et caractéristiques quelque soit le procédé de préparation mis en œuvre : diminution du coefficient d'extinction, déplacement des maxima vers les courtes longueurs d'ondes, apparition d'un maximum secondaire dans le proche ultraviolet. Mais, en plus de ces caractères, le critère en définitive le plus sûr pour distinguer un isomère «cis-trans» d'un éventuel produit de transformation chimique (d'un dérivé d'oxydation par exemple), est, nous semble t-il, la réversion du phénomène.

La première partie de notre travail sera consacrée aux divers procédés qui permettent de réaliser la stéréoisomérisation et à une étude critique de l'ensemble des travaux relatifs aux isomères géométriques naturels et artificiels de ces pigments.

Dans la seconde partie, le détail de notre contribution expérimentale sera précédé de la description de contrôles expérimentaux effectués sur des solutions de carotène, et suivi d'une discussion générale permettant de confronter l'ensemble des résultats.

PREMIERE PARTIE

ETUDE HISTORIQUE ET CRITIQUE DES TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I

Facteurs susceptibles de provoquer l'isomérisation «cis-trans» des caroténoïdes et techniques mises en œuvre.

Nous avons signalé ci-dessus que dans la nature, les pigments caroténoïdes se présentent le plus généralement sous la forme entièrement « trans », la molécule affectant alors la forme d'un bâtonnet approximativement rectiligne.

Dans quelques cas cependant des isomères «cis-trans» ont été découverts dans les milieux naturels *(1) (4)*, mais ces formes restent l'exception et révèlent même parfois une anomalie génétique ou métabolique. Il est au contraire relativement facile d'obtenir artificiellement à partir d'un caroténoïde «trans» des dérivés «mono» ou «polycis». Les divers moyens couramment utilisés sont :

1°) Action de la température :

L'action de la température sur les solutions de caroténoïdes se traduit par le fait qu'un tiers des molécules sont remaniées et prennent des configurations «cis» (surtout «mono-cis» ou «bi-cis»), CARTER et GILLAM *(24)* l'ont montré en étudiant des solutions de caroténoïdes dans un mélange de benzène et d'éther de pétrole (*) :

A — 2° C. après 12 semaines, la transformation est encore insignifiante,

A + 20° C. on constate une transformation notable au bout de 49 jours,

A la température de l'ébullition, le phénomène est beaucoup plus rapide : en général après 3 heures d'ébullition (réfrigérant à reflux) l'équilibre est atteint.

2°) Adsorption chromatographique :

Le fait que le simple contact avec un agent adsorbant soit susceptible de provoquer une isomérisation «cis-trans» des caroténoïdes a, semble-t-il, été pour la première fois observé par GILLAM et EL RIDI *(8)*. Ces auteurs ont en effet constaté qu'une solution éthéro-pétrolique de β-carotène, filtrée sur alu-

(*) Ether de pétrole E = 65° C.

mine donne lieu, après développement du chromatogramme, à la formation de plusieurs zones, qui après élution présentent des caractéristiques spectrales légèrement différentes de celles du produit de départ. GILLAM et EL RIDI ont d'abord attribué à l'adsorbant (en l'occurence l'oxyde d'aluminium) un rôle déterminant dans cette transformation. LEDERER *(19)*, adoptant cette interprétation en a tiré cette importante déduction «qu'il faut parfois employer l'adsorption chromatographique avec précaution».

Cependant, ZECHMEISTER et ses collaborateurs ont contesté que l'alumine soit capable de produire de tels remaniements moléculaires. GILLAM et EL RIDI, eux-mêmes, *(21)* abandonnèrent leur interprétation première, et il fut généralement admis que l'isomérisation d'un caroténoïde en solution était un phénomène spontané (KARRER et JUCKER *(5)* p. 38).

Récemment cependant MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN *(9)*, ont étudié systématiquement l'action des oxydes métalliques sur les pigments caroténoïdes : du carotène mis en solution à froid au contact de bioxyde de manganèse est oxydé. En même temps s'observent des phénomènes d'isomérie «cis-trans» qui accompagnent la coupure oxydante des molécules primitivement sous la configuration «trans».

Beaucoup d'oxydes métalliques provoquent une isomérisation au niveau de la double liaison centrale du caroténoïde indépendamment de la coupure oxydante.

Le schéma expérimental est le suivant : un échantillon de caroténoïde cristallisé entièrement «trans» dissous dans du benzène ou de l'éther de pétrole, est agité avec du bioxyde de manganèse ou de l'alumine pour chromatographie. La fiole contenant le mélange est abandonnée à l'obscurité à la température du laboratoire : on constate que le «cis-peak» prend de plus en plus d'importance avec le temps de contact tandis que la densité optique de la bande principale décroît, et que le maximum d'absorption se déplace vers les courtes longueurs d'ondes.

MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN se sont adressés ensuite à un adsorbant ne donnant pas lieu à la «coupure oxydante» dans les conditions décrites : l'oxyde de titane. Un

important «cis-peak» est apparu sous l'effet de l'adsorption par l'oxyde de titane.

Le fait entrevu par GILLAM et EL RIDI que les oxydes métalliques sont susceptibles de provoquer l'isomérie «cis-trans» des caroténoïdes se trouve ainsi démontré. C'est la double liaison centrale des caroténoïdes symétriques qui paraît la plus sensible à ce phénomène d'isomérie (conformément aux remarques théoriques de ZECHMEISTER, LE ROSEN, SCHROEDER, POLGAR et PAULING *(10)*).

3°) Action de la lumière :

ZECHMEISTER et LEMMON *(6)* ont également montré que la lumière est susceptible de produire une isomérisation «cis-trans» des caroténoïdes. Une solution de 5 mg de caroténoïde dans 50 ml de benzène a été exposée au soleil pendant des temps déterminés. Dans de telles circonstances, l'intensité de la couleur de la solution diminue graduellement et l'apparition de stéréoisomères est constatée au spectrophotomètre.

4°) Action de la fusion :

ZECHMEISTER et LEMMON *(6)* ont aussi étudié l'action de la fusion sur les caroténoïdes cristallisés. Un mélange de 5 mg d'un caroténoïde et de 20 mg de naphtalène est placé dans un tube. Le tube scellé est gardé dans un bain à 160° C. pendant 15 minutes et rapidement refroidi dans de l'eau glacée. Le mélange est alors dissous dans du benzène, refroidi et additionné d'éther ; la solution est ensuite versée sur une colonne de TSWETT et développée avec un mélange d'éther de pétrole et de benzène : des zônes supplémentaires correspondant aux composés néo-formés apparaissent alors sur la colonne.

5°) Action de l'iode :

L'isomérisation des caroténoïdes sous l'action catalytique de l'iode a été décrite pour la première fois par KARRER et JUCKER *(5)* ; de nombreux travaux expérimentaux ont été ensuite consacrés à l'étude du phénomène par ZECHMEISTER et TUZSON *(25)*.

Ces auteurs ont expérimenté plus particulièrement sur le lycopène, le β-carotène, la cryptoxanthine, la lutéine (ou xanthophylle), la zéaxanthine et la taraxanthine ; ces substances se sont comportées sensiblement de la même manière et ont donné lieu à la formation de plusieurs isomères.

La technique consiste à abandonner pendant un temps plus ou moins long une solution benzénique du caroténoïde dans laquelle on a dissous quelques milligrammes d'iode (10 mg pour 100 ml). La solution ainsi obtenue est alors chromatographiée pour séparer les isomères.

Il est intéressant de noter que ces isomères sont comparables à ceux obtenus par les autres méthodes d'isomérisation *(26)*.

6°) Action des acides :

La possibilité de provoquer une stéréoisomérisation des caroténoïdes par action des acides a été entrevue et étudiée pour la première fois par QUACKENBUSH, STEENBACK et PETERSON *(27)*.

Ultérieurement plusieurs observations ont été faites par STRAIN *(28)*, STRAIN et MANNING *(29)* sur divers pigments caroténoïdes végétaux. Ces auteurs ont ainsi pu confirmer l'action des acides sur la stéréoisomérisation : selon eux l'isomérisation résultant de l'action catalytique d'un acide, peut être encore accélérée par l'addition de quelques bases organiques telles que la pyridine, la quinoléine ou la diméthylamine.

Quels que soient les procédés d'isomérisation employés, c'est toujours par chromatographie que sont séparés les différents stéréoisomères.

En ce qui concerne les courbes spectrales, on remarque non seulement un abaissement du coefficient d'extinction, mais aussi un déplacement graduel des maxima d'absorption dans la région visible vers les courtes longueurs d'ondes. Il semble que ce déplacement soit de 5 à 6 mμ environ pour un seul re-

maniement de «trans» à «cis», et de 35 mμ pour la transformation d'une forme entièrement «trans» en «poly-cis» *(10)*.

Un autre phénomène assez constant se manifeste : c'est l'apparition d'un maximum localisé dans la région du proche ultra-violet (entre 330 et 380 mμ) dans laquelle la courbe d'absorption était auparavant aplatie ; ce phénomène a été dénommé le «cis peak effect» *(30)* pour traduire le passage de la forme «trans» à la forme « cis».

Selon PAULING, le «cis-peak» serait d'intensité maximale pour les dérivés «mono-cis», c'est-à-dire lorsque la molécule affecte approximativement la forme d'un V ouvert. Toujours selon PAULING, cet accident proviendrait du champ magnétique qui est maximum pour cette forme en V.

CHAPITRE II

Formes «Mono et Poly-cis» naturelles et artificielles des Caroténoïdes.

Dans le présent chapitre nous donnons une revue d'ensemble des travaux qui ont été consacrés à l'isomérisation des caroténoïdes et à l'étude des formes stéréoisomères artificielles ou naturelles.

Avant d'aborder cette question nous rappellerons tout d'abord que le nombre d'isomères connus, relativement grand dans certains cas, est toujours de beaucoup inférieur au nombre prévu par la théorie.

Le tableau ci-dessous donne la liste des caroténoïdes pour lesquels l'existence de plusieurs stéréoisomères a été reconnue et étudiée (*).

Bixine *(16)*

Crocétine *(2)*

β-carotène (7) (8) *(31) (32)*

α-carotène *(33)*

Capsanthine *(45) (51)*

Lycopène *(4) (1)*

Prolycopène *(4)*

Cryptoxanthine *(7)*

Xanthophylle *(55) (56) (57)*

Zéaxanthine *(25)*

Physaliène *(25) (56)*

Taraxanthine *(25)*

Capsorubine *(57)*

γ-carotène *(58)*

Pro-γ-carotène *(59)*

Célaxanthine *(62) (63)*

Fucoxanthine *(29)*

Gazaniaxanthine *(65)*

Spirilloxanthine *(68)*

BIXINE : (formule développée Fig. 1, p. 33).

Découverte par BOUSSINGAULT *(17)* la bixine est le principal pigment des graines de «Bixa Orellana». C'est le premier caroténoïde pour lequel une isomérie «cis-trans» ait été démontrée.

(*) Pour les formules développées, voir figures 1, 2, 3, 4

HERZIG et FALTIS *(16)* ont retiré de ces graines, à côté de la bixine, un isomère qu'ils ont dénommé β-bixine. Son point de fusion est plus élevé et la stabilité de ce nouveau pigment est plus grande que celle de la bixine qui représente donc une forme labile ; il se caractérise aussi par un spectre dont le maximum d'absorption est décalé vers les grandes longueurs d'ondes par rapport à celui de la bixine.

KARRER, HELFENSTEIN, WIDMER et van ITALLIE *(18)* ont montré en 1929 que la bixine naturelle peut être convertie en β-bixine par action de l'iode et ils ont interprété cette réaction comme une transformation «cis-trans». Peu après, KUHN et WINTERSTEIN *(2) (34)* confirment que la catalyse par les halogènes est capable d'effectuer des transformations de cet ordre.

CROCETINE :

Le principal pigment caroténoïde du safran est la crocine obtenue pour la première fois par KARRER et SALOMON *(35)*. KARRER et MIKI *(36)* ont montré que la crocine est un glucoside de la crocétine dont KARRER et SALOMON *(35)* ont établi la structure (Fig. 1 p. 33).

Le premier travail sur la stéréoisomérisation de la crocétine a été effectué par KUHN et WINTERSTEIN *(2)* qui ont préparé l'ester diméthylique de la crocétine (point de fusion 222° C.). Ils ont obtenu à partir de ce corps un isomère dont le point de fusion est de 141° C. La transformation se produit déjà sous l'action de la lumière et aussi par d'autres moyens : élévation de température et catalyse par l'iode.

KUHN et ses collaborateurs, par analogie avec ce qui avait été établi pour la bixine, en sont arrivés à cette conclusion qu'il s'agissait ici encore d'un cas d'isomérie «cis-trans».

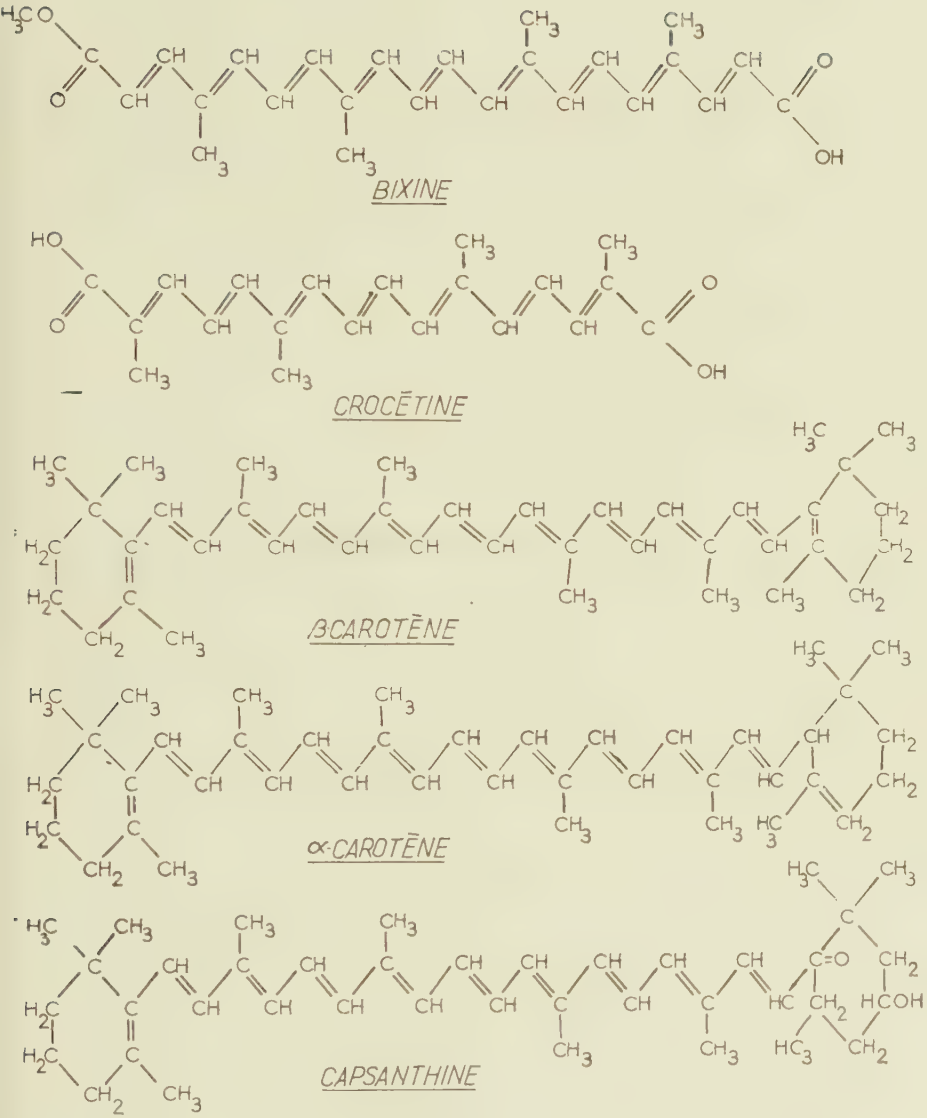


Fig. 1. — Formules développées de pigments caroténoïdes naturels.

Nous donnerons ci-dessous à titre d'exemple la nomenclature ancienne et actuelle des différents isomères de la crocétine (d'après KARRER et JUCKER p. 273 *(5)*).

Nomenclature des isomères de la crocétine.

NOUVELLE NOMENCLATURE	Point de fusion	Formes géométriques	ANCIENNE NOMENCLATURE
Crocétine stable	285° C	Trans	α-Crocétine
Ester mono-méthylique de la crocétine stable	218° C	Trans	β-Crocétine
Ester diméthylique de la crocétine stable	222° C	Trans	γ-Crocétine
Ester diméthylique de la crocétine labile	141° C	Cis	Pigment de R. KUHN

L'ester diméthylique de point de fusion 141° C. se présente en tablettes allongées, les cristaux sont très jaunes. Une partie se dissout dans 5.900 parties de méthanol à 20° C.

Les maxima d'absorption dans l'éther de pétrole (E = 70-80° C.) se situent à 445 et 442 mμ ; dans le chloroforme à 458 et 432,5 mμ. L'ester diméthylique fondant à 222° C. (forme stable) cristallise en forme d'écailles rouge orangées. A 20° C. il s'en dissout une partie dans 100.000 parties de méthanol (17 fois moins soluble que le précédent).

Les maxima d'absorption dans l'éther de pétrole (E = 70-80° C.) sont à 450,5 et 424,5 mμ ; dans le chloroforme à 463 et 434,5 mμ. Nous constatons donc comme dans toutes stéréoisomérisations un déplacement des maxima dans la région visible vers les courtes longueurs d'ondes.

β-CAROTENE : (formule développée Fig. 1 p. 33).

GILLAM et EL RIDI en 1935 *(8)* ont montré qu'une solution de β-carotène adsorbée sur alumine donne après développement du chromatagramme plusieurs zônes colorées : la principale de ces zônes ainsi isolées a été dénommée pseudo-α-carotène.

Ce nouveau pigment qui fond à 166° C. (alors que le point de fusion du β-carotène est de 187° C.) est entièrement épiphasique, optiquement inactif, et possède une activité vitaminique A prononcée. Ses caractères spectraux sont les suivants :

Maxima d'absorption dans :

Sulfure de carbone	489,5	-	459	mμ
Benzène	470	-	440	mμ
Ether de pétrole	456	-	427	mμ
Chloroforme	469	-	438	mμ
Cyclohexane	454	-	482	mμ

Plus récemment, ZECHMEISTER et TUZSON *(7)*, BEADLE et ZSCHEILE *(37)*, ont retrouvé des résultats sensiblement identiques. Ils ont montré que le β-carotène est partiellement isomérisé en pseudo-α-carotène (néo-β-carotène) quand il est chauffé dans des solvants variés. ZECHMEISTER et POLGAR *(32)* par différents traitements ont obtenu 12 isomères du β-carotène.

Ils trouvèrent, après ébullition à reflux dans l'éther de pétrole quatre pigments : néo-β-carotène U, néo-β-carotène B, néo-β-carotène E et un isomère labile. Suivant le solvant, le rendement diffère : en effet KEMMERER et FRAPS *(38)* ont montré que du β-carotène soumis pendant trente minutes à la température d'ébullition, donnait naissance à 9. p. 100 de néo-β-carotène B dans l'hexane, 10,4 p. 100 dans l'alcool méthylique et 18,8 p. 100 dans l'alcool éthylique.

Les effets de la température sur la transformation du β-carotène en pseudo-α-carotène ont été étudiés par CARTER ett GILLAM *(24)*. Ils ont constaté qu'à - 2° C., au bout de 12 semaines, la formation de néo-β-carotène ne dépasse pas 2,5 p. 100, tandis qu'elle est de 11 p. 100 en 7 semaines lorsque la solution est maintenue à la température du laboratoire (= 20° C.). A 80° C., l'équilibre est atteint en moins de 3 heures et la proportion de pseudo-α-carotène est de 31 p. 100.

Les isomères peuvent être séparés par chromatographie sur une colonne de TSWETT. Le néo-β-carotène adsorbé au dessus de la zone du β-carotène possède un degré de stabilité

très grand, il peut être isolé, cristallisé et gardé pendant plusieurs mois sans changement *(39)*.

La transformation stéréochimique du β-carotène par la chaleur en néo-β-carotène B a été également décrite par SAVINOV et MIKHAJLOVNINA *(40)*. Ils constatent que la température optimale pour obtenir le maximum d'isomères du β-carotène est 100° C. pendant 3 heures. L'apparition du «cis-peak» à 338 mμ confirment l'isomérisation. A des températures plus élevées (150 - 200° C.) s'observe encore le même phénomène, mais avec en même temps formation de produits de dégradation.

Nous avons vu également ci-dessus que l'adsorption sur alumine provoque l'isomérisation *(8)*.

MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN *(9)* ont souligné les transformations subies par les caroténoïdes au cours de l'adsorption sur divers oxydes métalliques. Ils ont insisté sur le fait que la double liaison centrale est celle qui change le plus facilement de forme. Après différents temps de contact (20 h., 40 h., 114 h., 1 mois) d'une solution éthéro-pétrolique de β-carotène entièrement «trans» avec 20 g. d'alumine, le «cis-peak» prend de plus en plus d'importance.

Avec de l'oxyde de titane, apparaît un intense «cis-peak» au bout de 22 h. à l'obscurité. En prolongeant le temps de contact de l'oxyde de titane sur le β-carotène (20 jours à basse température : - 15° C.), une autre configuration géométrique se manifeste, caractérisée par l'augmentation du maximum d'absorption dans les courtes longueurs d'ondes (de 453 à 448 mμ dans l'alcool).

Le point de fusion du carotène recristallisé à ce stade est identique à celui du β-carotène initial. Le traitement par l'iode de la solution éthéro-pétrolique fait réapparaître un «cis-peak» important, tandis que s'abaisse le maximum à 260 mμ et que se relève le maximum principal dans le visible en se replaçant à 451 mμ.

Selon les règles énoncées par ZECHMEISTER, une nouvelle configuration devrait être assignée à ce β-carotène ob-

tenu par un séjour prolongé sur l'oxyde de titane, le carbonate de fer, l'oxyde de zinc et l'oxyde stanneux.

Avec le bioxyde de manganèse, il se produit une oxydation et une coupure de la molécule en son centre ; par contre, l'alumine, l'oxyde de titane et l'oxyde ferrique ne provoquent que la plicature du caroténoïde.

α-CAROTENE (formule développée Fig. 1, p. 33) :

La carotte contient une quantité importante d'α-carotène. Ce pigment diffère du β-carotène (KUHN et LEDERER *(41) (42)*, KARRER, HELFENSTEIN, WEHRLI, PIEPER et MORF *(43)*) par la disposition du système de doubles liaisons ; il est fortement dextrogyre alors que le β-carotène est optiquement inactif. C'est en 1937 que la stéréoisomérisation «cis trans» de l'α-carotène a été mise en évidence *(33)*.

La formation des composés ainsi isolés fut interprétée comme étant due à l'action de l'adsorbant sur le pigment initial. En effet, des adsorptions répétées permettent d'obtenir des quantités croissantes d'isomères. Le nombre de stéréoisomères de l'α-carotène actuellement connu est de 32 *(4)* (rappelons que le nombre théorique est de $2^9 = 512$).

Les taux respectifs des stéréoisomères dépendent de la méthode d'isomérisation. ZECHMEISTER et POLGAR ont étudié l'action de la chaleur sur les solutions d'α-carotène dans l'hexane. Le rendement en isomères entièrement «trans» obtenus par l'action de la chaleur sur des néo-α-carotènes U,V,W, est toujours très faible. Les néo-α-carotènes U,V et W montrent en effet une thermostabilité considérable. Ils ne possèdent qu'un «cis-peak» peu accusé, ce qui d'après PAULING implique qu'il s'agit de composés «poly-cis».

La catalyse par l'iode conduit à des transformations semblables et les divers constituants du milieu peuvent être séparés sur la colonne de TSWETT : les pigments néo-formés sont adsorbés au dessous du pigment entièrement «trans» *(44)*.

CAPSANTHINE :

Dès 1817, BRACONNOT *(45)* étudia le pigment du paprika, mais c'est THUDICUM *(46)* qui le premier reconnut sa

nature caroténoïde ; ces observations furent confirmées ultérieurement *(47) (48) (49) (50).*

ZECHMEISTER et VON CHOLNOKY *(51)* obtinrent à l'état cristallisé le pigment du «Capsicum fructescens» ; ils le dénommèrent capsanthine et montrèrent que c'était un caroténoïde oxygéné renfermant un groupe hydroxyle et un groupe carbonyle *(52) (53).* Ils ont proposé la formule développée (Fig. 1 p. 33).

Ils ont également, dès 1936, étudié la stéréoisomérisation du pigment et ont constaté que l'isomérisation se traduit par les modifications suivantes des caractères spectraux : diminution du cœfficient d'extinction, déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'ondes.

Le nombre possible de stéréoisomères de la capsanthine est de 32, car, étant donnés les empêchements stériques, cinq doubles liaisons peuvent subir des remaniements «cis» *(4).*

Cependant ZECHMEISTER et VON CHOLNOKY n'ont réussi à isoler jusqu'à présent que trois composés néo-formés : les néo A, B et C capsanthine qui sont adsorbés au dessous du pigment «trans» sur colonne.

LYCOPENE (formule développée Fig. 2 p. 39) :

L'isomérisation du lycopène a été étudiée principalement par ZECHMEISTER et TUZSON *(7)* et par ZECHMEISTER, LE ROSEN, SCHROEDER, POLGAR et PAULING *(10).* Comme dans les autres cas d'isomérisation des caroténoïdes, le phénomène se manifeste par un abaissement du cœfficient d'extinction et un déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'ondes. L'étude minutieuse de ces transformations a conduit ZECHMEISTER et ses collaborateurs à admettre qu'un déplacement de 5 à 6 mμ correspond au remaniement «trans-cis» d'une seule double liaison, tandis que la transformation du dérivé «trans» en «poly-cis» produit un décalage de 35 à 45 mμ. L'obtention des isomères géométriques est extrêmement facile et rapide, puisqu'il suffit de porter pendant 5 minutes à l'ébullition à reflux la solution benzénique pour provoquer une transformation notable. Ce comportement comparé à celui d'autres caroténoïdes montre que, suivant la constitution chi-

mique, l'isomérisation est plus ou moins complète et plus ou moins rapide.

Développant la théorie de l'isomérisation du lycopène, ZECHMEISTER et ses collaborateurs ont donné le schéma de quelques-unes des formes probables, compte tenu des empêchements stériques. Nous les avons reproduites figure 3 (p. 41)

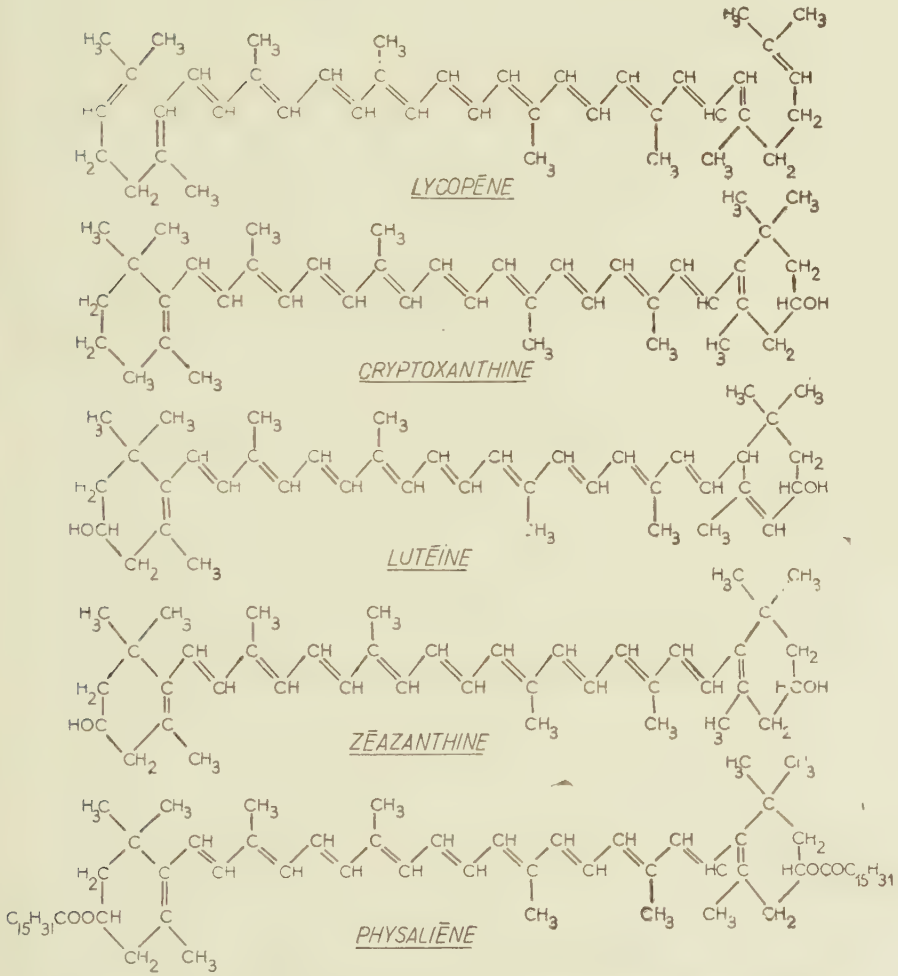


Fig. 2. — Formules développées de pigements caroténoïdes naturels.

d'après ZECHMEISTER, LE ROSEN, SCHROEDER, POLGAR et PAULING *(10)*.

Le néo-lycopène se transforme en lycopène «trans» lorsqu'on tente de le faire cristalliser.

L'isomérisation du lycopène a été également obtenue par adsorption chromatographique sur oxyde métallique par MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN *(9)* ; une solution éthéro-pétrolique de lycopène mise au contact d'alumine ou d'oxyde de titane se modifie progressivement et il est possible de suivre la transformation en fonction du temps. L'étude spectrophotométrique permet de constater en particulier l'apparition d'un important «cis-peak».

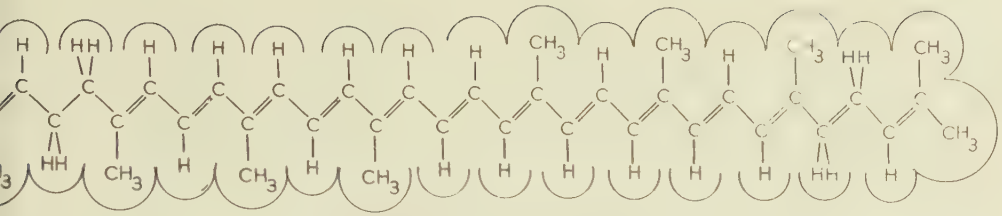
Rappelons que ce sont ces expériences de MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN qui ont définitivement établi l'isomérisation des caroténoïdes au contact des oxydes métalliques, fait antérieurement entrevu par GILLAM et EL RIDI *(8)*.

Une isomérie «cis-trans» du lycopène avait d'ailleurs été antérieurement découverte dans les millieux naturels. En effet, en 1941, ZECHMEISTER, LE ROSEN, WENT et PAULING *(4)*, étudiant les caroténoïdes de certaines variétés de tomates (Tangerine Tomato) ont décelé un pigment qu'ils ont dénommé prolycopène et qu'ils ont reconnu être un stéréoisomère naturel «poly-cis» de la forme entièrement «trans» régulièrement présente chez les végétaux.

Pour rendre compte de ce fait, ZECHMEISTER *(1)* invoque une altération de l'appareil génétique du végétal. Dans les baies de Pyrocantha Angustifolia, ZECHMEISTER et PINCKARD *(54)* ont réussi à isoler six nouveaux isomères du lycopène dont nous donnons ci-dessous la liste (*(5)* p. 125) et les caractéristiques essentielles.

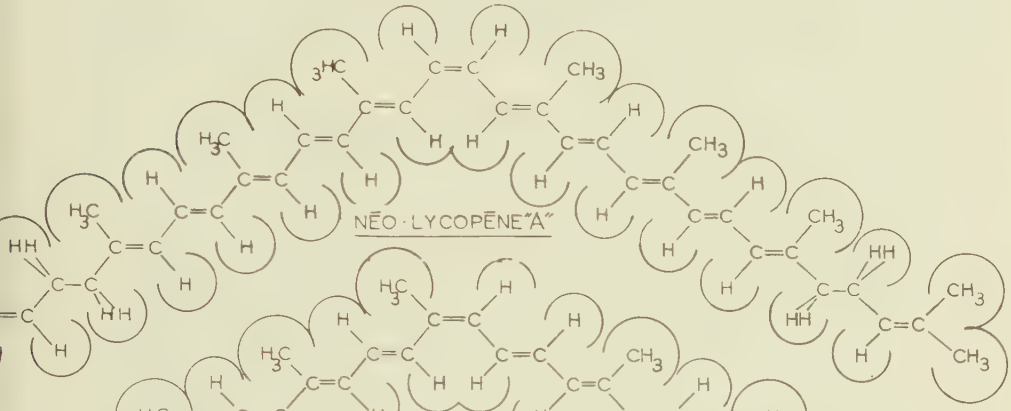
Trois d'entre eux ont été obtenus à l'état cristallisé :

		Maximum d'absorption dans l'hexane
Poly-cis-lycopène I	F. 93-95°	444 - 445 mμ
Poly-cis-lycopène II	F. 85-87°	441 - 442 mμ
Poly-cis-lycopène III	F. 105-106°	443 - 446 mμ



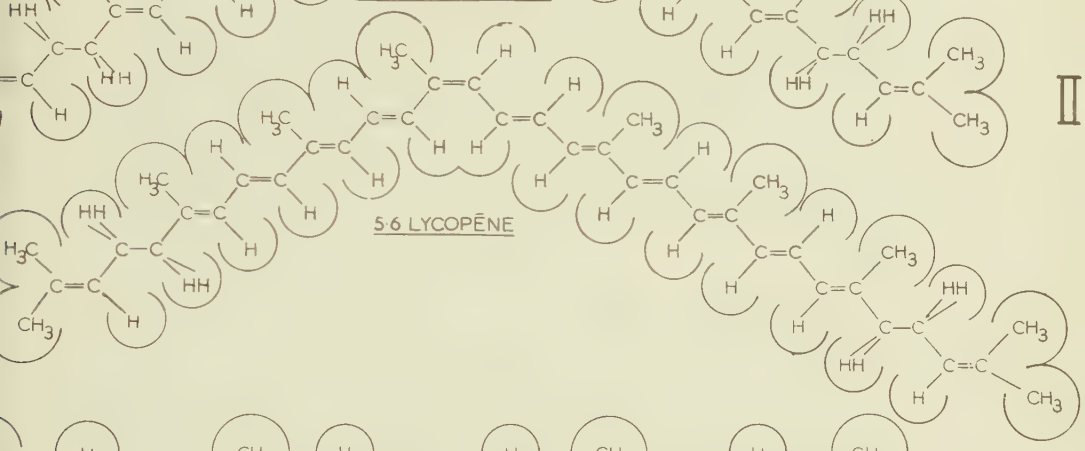
I

LYCOPÈNE entièrement "TRANS"



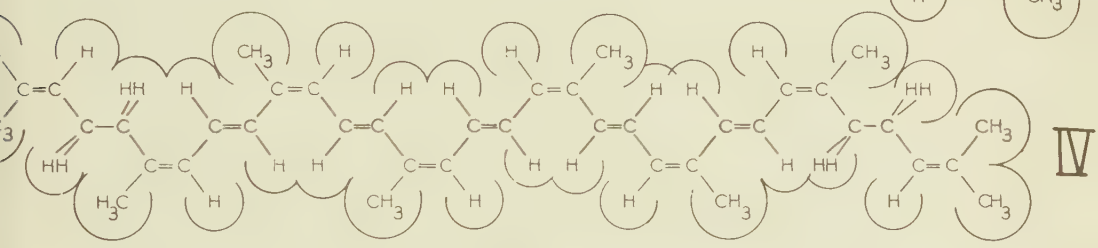
NÉO-LYCOPÈNE "A"

II



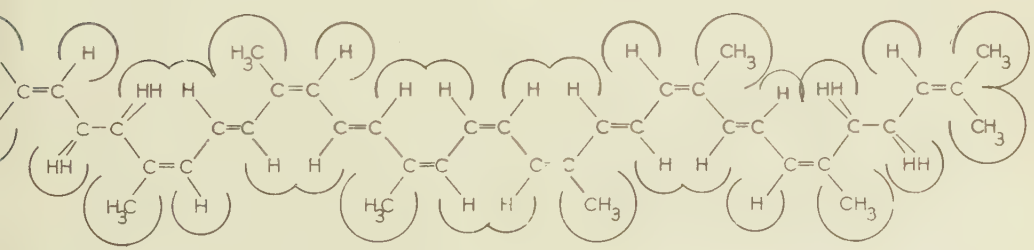
5-6 LYCOPÈNE

III



IV

PROLYCOPÈNE



V

LYCOPÈNE POLY-CIS

Fig. 3. — Représentation schématique de quelques formes stéréoisomères du lycopène : lycopène entièrement « trans » I — néolycopène A II — 5-cis lycopène III — prolycopène IV — lycopène poly-cis V (10)

Poly-cis-lycopène IV ..... 426 mμ
Poly-cis-lycopène V ..... 431 - 432 mμ
Poly-cis-lycopène VI ..... 433 mμ

CRYPTOXANTHINE (formue développée, fig. 2, p. 39)

ZECHMEISTER et TUZSON *(7)* ont reconnu que la cryptoxanthine s'isomérise plus rapidement et plus facilement que le β-carotène.

Les premières expériences n'ont montré seulement qu'un stéréoisomère naturel de la cryptoxanthine la néo-cryptoxanthine. Cette isomérisation, qui se produit spontanément dans les solutions abandonnées à la température ordinaire, tend vers un équilibre. La vitesse de transformation est considérablement augmentée par l'élévation de la température.

La lumière solaire a également un effet catalytique. L'iode et la chaleur provoquent des transformations identiques.

STRAIN *(55)*, puis BEADLE et ZSCHEILE *(37)* ont effectué l'étude spectrophotométrique du phénomène et ont enregistré l'apparition d'un important «cis-peak» à 340 mμ dans le benzène.

XANTHOPHYLLE (*) :

STRAIN *(55)*, ZECHMEISTER et ses collaborateurs *(25) (56) (57)*, ont étudié l'isomérisation de la xanthophylle par les méthodes habituelles : 5,5 mg de lutéine en solution dans 125 ml de benzène ont été portés pendant 30 minutes à ébullition. L'analyse chromatographique a été effectuée sur carbonate de calcium. Le chromatogramme a été développé avec 120 ml d'un mélange à volumes égaux de benzène et d'éther de pétrole. Il apparaît ainsi deux zones colorées bien nettes séparées par une zone incolore. La zone supérieure jaune franc correspond à la néolutéine A, la zone inférieure, orangée, correspond à la lutéine.

Les caractères spectraux sont les suivants :
pour la lutéine :

— λ max : 508-476 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 489-458 mμ dans le benzène

(*) Synonyme lutéine (Fig. 2., p. 39).

pour la néo-lutéine A :

— λ max : 501-468 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 483,5-452 mμ dans le benzène.

L'isomérisation d'une solution benzénique de xanthophylle après action de l'iode pendant 30 minutes a permis d'individualiser néo-lutéine A et néo-lutéine B :

néo-lutéine A :

— λ max : 501-469 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 484-452 mμ dans le benzène.

néo-lutéine B :

— λ max : 502-470 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 483-453 mμ dans le benzène.

ZEAXANTHINE (formule développée Fig. 2, p. 39)

Ce pigment se trouve à l'état naturel dans les graines de maïs. ZECHMEISTER et TUZSON *(25)* ont obtenu trois stéréoisomères, néo A, néo B et néo C dont les caractères spectraux sont les suivants (d'après KARRER et JUCKER *(5)* p. 189) :
néo-zéaxanthine A :

— λ max : 508-474,5 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 489-457,5 mμ dans le benzène
— λ max : 478,5-448,5 mμ dans l'éthanol.

néo-zéaxanthine B (caractères spectraux voisins de ceux de la néo-zéaxanthine A).

néo-zéaxanthine C :

— λ max : 502-470 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 488,5-455 mμ dans le benzène
— λ max : 473-443,5 mμ dans l'éthanol.

Tous trois sont considérés par ZECHMEISTER et TUZSON comme des dérivés « mono-cis ». Cependant pour la forme C, le décalage des maxima vers les courtes longueurs d'ondes tendrait plutôt à faire admettre qu'il s'agit d'un dérivé « bi-cis ».

Après ébullition à reflux d'une solution de zéaxanthine dans du benzène pendant 30 minutes, on obtient les isomères néo A et néo B en faible proportion ; mais en outre se forment des pigments nouveaux que ZECHMEISTER et LEMMON considèrent comme n'appartenant pas à la série de la zéaxanthine *(6)*. L'étude de ces nouvelles substances reste encore à faire.

PHYSALIENE (formule développée, Fig. 2 p. 39)

C'est le dipalmitate de zéaxanthine. Son isomérisation a été étudiée par ZECHMEISTER et TUZSON *(25)*, ZECHMEISTER, VON CHOLNOKY et POLGAR *(56)*. La solution de 5 mg de physaliène dans 50 ml d'éther de pétrole (E = 70-80° C.) est portée à l'ébullition à reflux. Les isomères sont séparés par chromatographie sur un mélange de carbonate de calcium léger et de carbonate de calcium lourd (dans le rapport de 1 à 3). La proportion des isomères est différente suivant le temps d'ébullition.

Après 15 minutes d'ébullition, la solution renferme 32 p. 100 de néo-physaliène ; elle en renferme 35 p. 100 après 30 minutes ; après 60 minutes, le taux maximum de 42 p. 100 est atteint.

La catalyse par l'iode donne les mêmes proportions d'isomères. Les maxima d'absorption sont :
physaliène :

— λ max : 516-481 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 495-461 mμ dans le benzène.

néo-physaliène :

— λ max : 508,5-476,5 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 490-452 mμ dans le benzène.

TARAXANTHINE :

La taraxanthine est de constitution encore inconnue ; toutefois sa formule brute $C_{40}H_{56}O_4$ en fait un isomère de la violaxanthine.

L'isomérisation de la taraxanthine a été étudiée par ZECHMEISTER et TUZSON *(25)* : 4 mg de taraxanthine sont dissous dans 50 ml de benzène renfermant 50 γ d'iode. La solution est abandonnée pendant 30 minutes ; après chromatographie sur carbonate de calcium et développement avec un mélange à volumes égaux de benzène et d'éther de pétrole, plusieurs zones sont révélées :

1°) une zone verdâtre à la surface, provenant vraisemblablement de l'addition d'iode,
2°) une zone orangée : la néo-taraxanthine A,
3°) une zone jaune citron : la néo-taraxanthine B nette-

ment séparée de la précédente par une bande incolore,

4°) une zone jaune d'or, la néo-taraxanthine C,

5°) une zone orange, la taraxanthine «trans» (forme initiale).

Les caractéristiques spectrales dans le sulfure de carbone sont :

taraxanthine «trans» :

— λ max : 501-469-440 mμ

néo-taraxanthine A :

— λ max : 494,5-464-434 mμ

néo-taraxanthine B :

— λ max : 497-470,5-443 mμ

néo-taraxanthine C :

— λ max : 480-449 mμ

CAPSORUBINE (formule développée Fig. 4, p. 46) :

Son isomérisation a été étudiée par ZECHMEISTER et VON CHOLNOKY *(57)*. Ces auteurs ont examiné le comportement de la capsorubine sous l'action de l'iode, de la chaleur et du temps. Ils ont montré que le colorant se comporte sensiblement comme la capsanthine, mais les isomères «cis-trans» n'ont pu être obtenus cristallisés.

Les spectres d'absorption sont les suivants :

capsorubine :

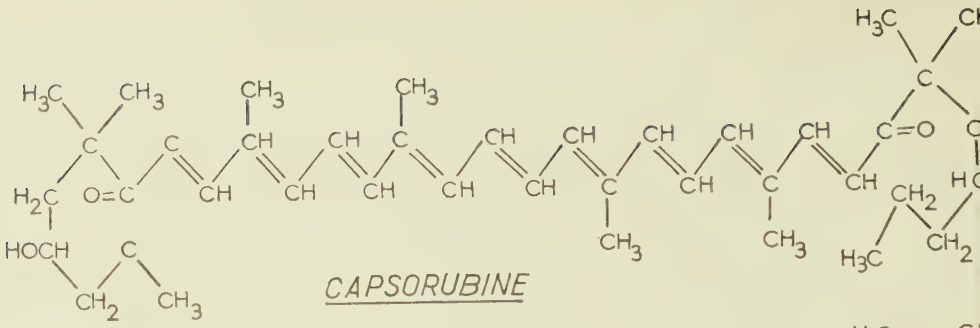
— λ max : 541-502-467 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 524-489-455 mμ dans le benzène
— λ max : 502-470-471 mμ dans l'hexane

néo-capsorubine A :

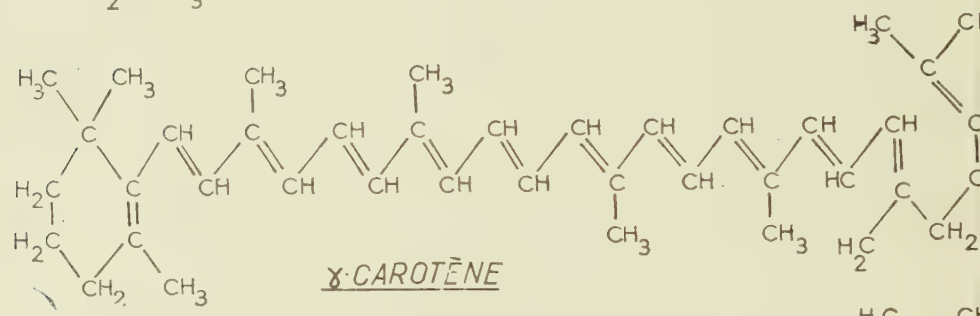
— λ max : 533-495-460 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 517-483-451 mμ dans le benzène
— λ max : 498-466-435 mμ dans l'hexane

néo-capsorubine B :

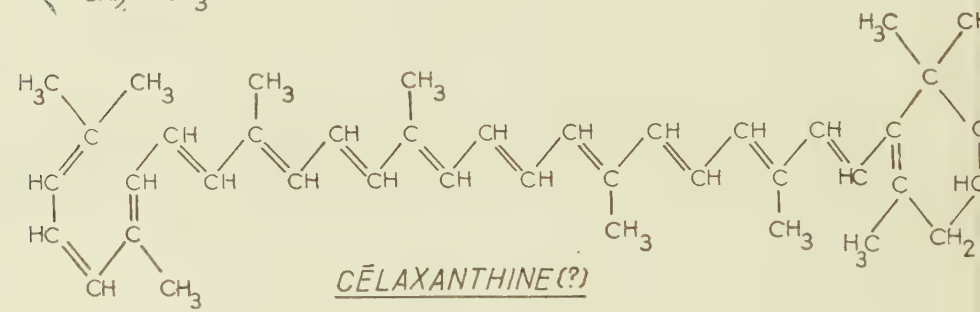
— λ max : 535-497-462 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 518-484-453 mμ dans le benzène
— λ max : 500-467-436 mμ dans l'hexane



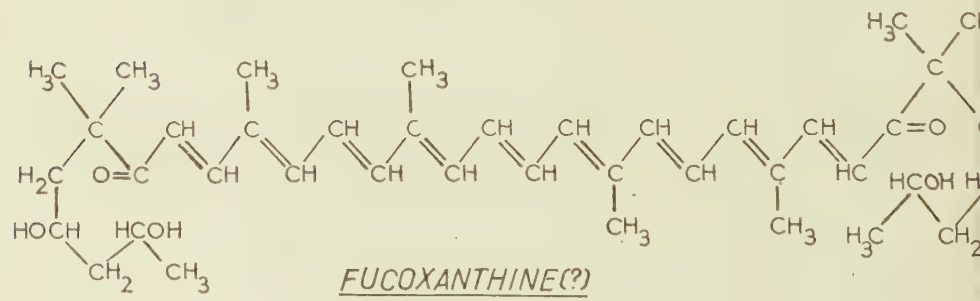
CAPSORUBINE



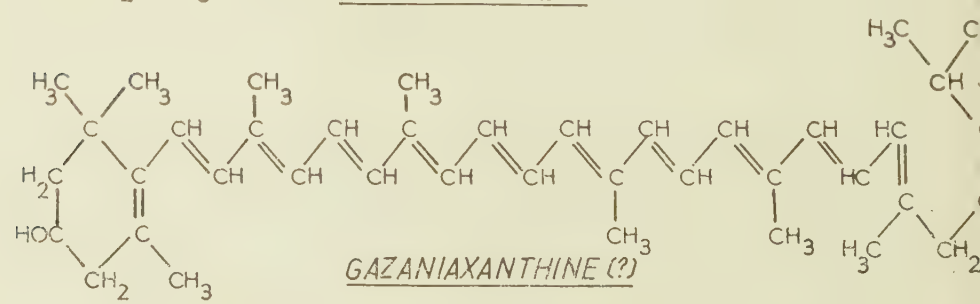
γ-CAROTÈNE



CÉLAXANTHINE (?)



FUCOXANTHINE (?)



GAZANIAXANTHINE (?)

Fig. 4. — Formules développées de pigments caroténoïdes naturels

capsorubine dipalmitate :

— λ max : 541-502-467 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 524-489-455 mμ dans le benzène
— λ max : 507-474-442 mμ dans l'hexane

néo-capsorubine dipalmitate :

— λ max : 536-496-463 mμ dans le sulfure de carbone
— λ max : 521-486-452 mμ dans le benzène
— λ max : 502-470-439 mμ dans l'hexane

γ-CAROTENE (formule développée, Fig. 4, p. 46)

L'isomérisation du γ-carotène dont la forme «trans» a été reconnue chez de nombreux végétaux (*(5)* p. 164), a été étudiée par ZECHMEISTER et POLGAR*(58)*, ZECHMEISTER et TUZSON *(25)*.

L'action de l'iode, l'ébullition à reflux des solutions, l'irradiation, la fusion des cristaux, provoquent la formation de plusieurs stéréoisomères séparables sur colonne de TSWETT. Aucun d'eux cependant n'a été obtenu cristallisé. Voici d'après KARRER et JUCKER (*(5)* p. 164), les diverses formes qui ont été séparées et leurs caractéristiques spectrales dans l'éther de pétrole :

néo-γ-carotène U	λ max : 489-457 mμ
néo-γ-carotène A	λ max : 486-455 mμ
néo-γ-carotène B	λ max : 486-455 mμ
néo-γ-carotène H	λ max : 489-457,5 mμ
néo-γ-carotène A'	λ max : 485,5-455 mμ
néo-γ-carotène B'	λ max : 486-455 mμ
néo-γ-carotène G'	λ max : 483-452 mμ
(natural-γ-carotène)	λ max : 494-461,5 mμ

ZECHMEISTER et ses collaborateurs ont également étudié l'activité vitaminique des isomères et montré que ceux-ci ne possèdent plus que la moitié de l'activité de la forme «trans» *(1)*.

D'autre part, ZECHMEISTER et SCHROEDER *(59)* ont découvert dans les fruits de Butia Eriospatha Becc. et Butia Capitata un nouveau pigment, le pro-γ-carotène. Ultérieure-

ment, la présence de pro-γ-carotène a encore été décelée dans le Pyracantha Angustifolia Schneid *(3)*, dans l'Evonymus Fortunei L. *(60)* et le Mimulus Longiflorus Grant *(61)*. ZECHMEISTER et SCHROEDER *(59)* ont établi que le pro-γ-carotène est un stéréoisomère du γ-carotène : il s'agit donc d'un cas d'isomérie naturelle. D'ailleurs, par fusion des cristaux, ébullition de la solution, contact avec de l'acide chlorhydrique concentré ou enfin de l'iode, le pro-γ-carotène donne un mélange d'isomères parmi lesquels figure le γ-carotène «trans».

CELAXANTHINE (formule développée Fig. 4, p. 46) :

Dans le mélange complexe des caroténoïdes des baies de Celatrus Scandens se trouvent environ 80 p. 100 de zéaxanthine (en majeure partie estérifiée), 15 p. 100 de célaxanthine *(62)*, 3 p. 100 de β-carotène et une petite quantité d'un ester d'hydroxy-γ-carotène (rubixanthine) *(63)*.

Le spectre de la célaxanthine est identique à celui du torulène isolé par LEDERER d'une levure rouge (Torula Rubra) *(64)*. Les affinités d'adsorption sont cependant différentes ; la présence d'un groupement hydroxyle libre dans la célaxanthine en est la raison. Les deux pigments montrent un phénomène d'isomérisation spontanée. Après isomérisation, le chromatogramme révèle trois stéréoisomères : les néo-célaxanthines A, B et C.

FUCOXANTHINE (formule développée Fig. 4, p. 46) :

La fucoxanthine est le pigment des algues brunes. D'après HEIBRON et PHIPERS, la fucoxanthine se rapproche de la capsorubine et serait vraisemblablement la dihydro-capsorubine (LEDERER *(19)*).

Par adsorption chromatographique STRAIN et MANNING *(29)* ont isomérisé la fucoxanthine et ont obtenu les fucoxanthines a, b et c.

GAZANIAXANTHINE (formule développee, Fig. 4, p. 46) :

La gazaniaxanthine est le principal pigment polyénique des fleurs de Gazania Rigens (Composées) découvert par SCHON *(65)*. Il est intéressant de noter que les caroténoïdes des fleurs de Gazania du Portugal diffèrent de ceux des va-

riétés rencontrées dans le sud de la Californie (ZECHMEISTER et SCHROEDER *(66)*).

Les méthodes usuelles d'isomérisation aboutissent bien aux transformations «cis-trans» observées pour les autres caroténoïdes avec apparition d'un «cis-peak» vers 330 mμ.

SPIRILLOXANTHINE :

La stéréoisomérisation «cis-trans» de la spirilloxanthine a été étudiée essentiellement par POLGAR, VAN NIEL et ZECHMEISTER *(67)*.

Caroténoïde rouge brun, cristallisé, décrit par VAN NIEL et SMITH *(68)*, c'est le principal pigment bactérien de «Rhodospirillium Rubrum», famille des Athiorhodacées.

Les procédés habituels d'isomérisation transforment la spirilloxanthine «trans» en un mélange de plusieurs isomères dans lequel la néo-spirilloxanthine A prédomine ; ce dernier pigment est adsorbé immédiatement au-dessous du pigment «trans» sur la colonne de TSWETT *(67)*.

L'isomérisation de la spirilloxanthine dans le benzène ou l'hexane produit un «cis-peak» caractéristique dans le proche ultra-violet *(30)*.

Dans le sulfure de carbone, le «cis-peak» ne se manifeste pas. On observe seulement une augmentation des absorptions dans la région comprise entre 310 et 380 mμ. La spirilloxanthine naturelle est un composé entièrement «trans». La néo-spirilloxanthine A est un dérivé «bi-cis», l'une des deux doubles liaisons «cis» étant la double liaison centrale *(10)*.

STEREOISOMERISATION DE LA VITAMINE A ET DU RETINENE :

Notre étude est volontairement limitée à la stéréoisomérie dans la série des caroténoïdes. Cependant, la parenté de structure entre ces pigments et la vitamine A est trop étroite pour que nous ne donnions pas ici une analyse au moins succinte des remarquables travaux que WALD et HUBBARD ont consacrés à l'isomérisation «cis-trans» de l'axérophtol et du rétinène.

Ces recherches, en effet, ont grandement contribué à élucider le rôle de la vitamine A et de son aldéhyde dans les pro-

cessus visuels. Elles illustrent en même temps de façon saisissante les relations entre la forme des molécules organiques et leurs propriétés biologiques.

Une quinzaine d'années après que KARRER, MORF et SCHOPP *(69)* eurent précisé la structure de la vitamine A, ROBESON et BAXTER *(70)* ont séparé des eaux-mères de cristallisation de l'axérophtol, une forme différente de celle-ci ; ils l'ont dénommée la néo-vitamine A et ont reconnu qu'il s'agissait d'une isomérie «cis» de la forme naturelle entièrement «trans».

En utilisant les règles énoncées par ZECHMEISTER et son école, ROBESON et BAXTER s'appuyant sur les constantes physiques comparées des deux isomères géométriques (point de fusion, coefficient d'extinction), ont assigné à la néo-vitamine A la configuration représentée ci-dessous (Fig. 5, p. 51), la transformation de la forme «trans» en néo-vitamine A étant relative à la double liaison voisine de la fonction alcool qui termine la chaîne polyénique.

La néo-vitamine A a été recherchée dans les milieux naturels et en particulier chez les poissons par ROBESON et BAXTER. MEUNIER et JOUANNETEAU *(71)* lui ont également consacré plusieurs travaux. La néo-vitamine A représente donc un isomère «cis» naturel de la forme entièrement «trans» qui est la plus abondamment répandue.

HUBBARD et WALD *(22)* ont étudié l'isomérisation artificielle de la vitamine A par exposition à la lumière, en présence de traces d'iode et ont montré que dans ces conditions quatre ou cinq formes peuvent être obtenues.

Parallèlement à ces recherches, HUBBARD et WALD étudiant la synthèse «in vitro» de la rhodopsine (pigment rétinien de nombreux animaux), ont constaté que l'union de la protéine spécifique (opsine) avec son groupement prosthétique (rétinène) ne peut pas se faire lorsque celui-ci est sous la forme entièrement «trans», mais au contraire sous une forme «cis» qui apparaît ainsi comme spécifique.

HUBBARD et WALD ont préparé et obtenu à l'état cristallisé cinq formes isomères du rétinène : la forme entièrement «trans» (BALL, GOODWIN et MORTON *(72)* 1948), et quatre

formes qu'ils ont dénommées : néo-rétinènes A et B et iso-rétinènes A et B *(73) (74) (75)*.

HUBBARD et WALD ont montré que la forme entièrement «trans» et le néo-rétinène A ne se combinent pas à l'opsine. En présence de la protéine spécifique, le néo-rétinène B synthétise rapidement la rhodopsine, et le produit obtenu ne se distingue en rien de la rhodopsine extraite de rétines de grenouille ou de rétines de bœuf .

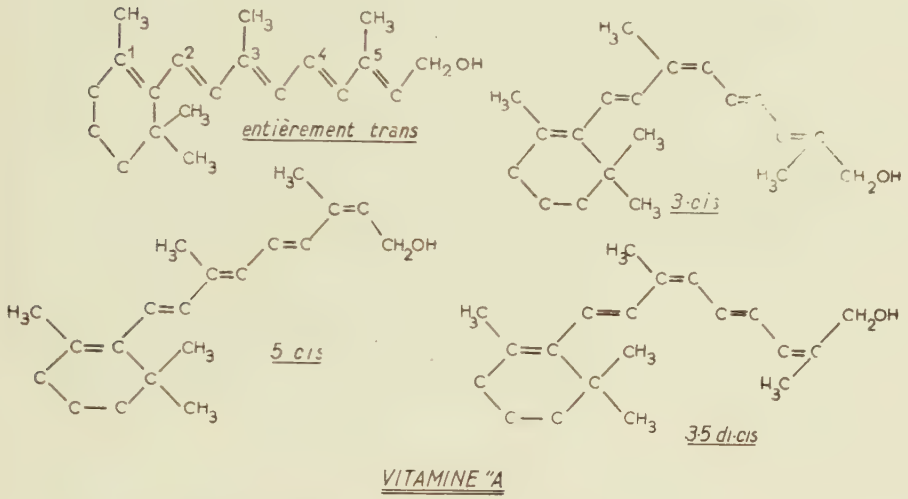


Fig. 5. — Structures de quatre isomères géométriques de la vitamine A d'après HUBBARD R. et WALD G. (22)

L'iso-rétinène A donne à peu près la même quantité de pigment photo-sensible et la réaction s'effectue sensiblement à la même vitesse, mais le spectre du pigment obtenu est décalé d'environ 13 mμ vers les courtes longueurs d'ondes par rapport à celui de la rhodopsine naturelle.

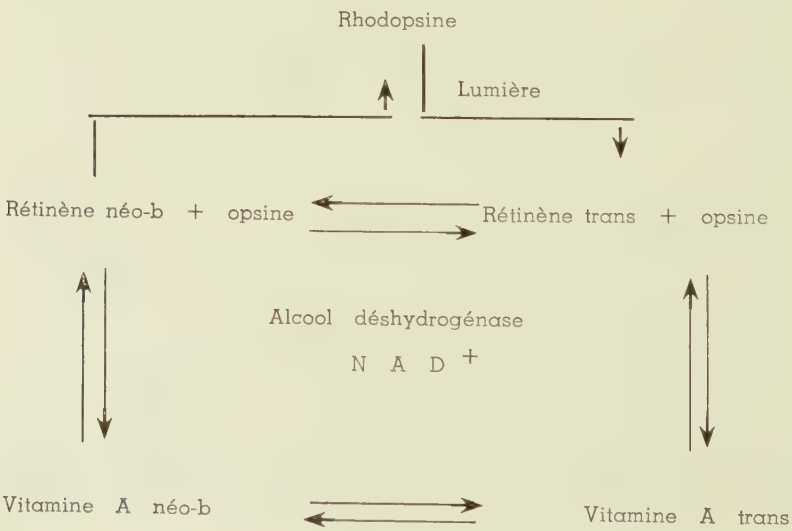
HUBBARD et WALD ont dénommé ce nouveau pigment photosensible : l'iso-rhodopsine, et ils ont reconnu que pour l'instant il n'y avait aucune preuve qu'il se forme dans la rétine «in vivo». Quant à l'iso-rétinène B, il est inactif en soi, mais a la propriété de s'isomériser en iso-rétinène A, de sorte qu'en

prolongeant l'incubation ou en soumettant la préparation à l'action de la lumière, on obtient ici encore de l'iso-rhodopsine.

Il convient de remarquer que les travaux d'HUBBARD et WALD font intervenir cinq isomères du rétinène alors que selon les règles énoncées par PAULING, il ne devrait exister, en raison des empêchements stériques, que quatre formes (celles qui sont mentionnées sur la Fig. 5, p. 51). Il est vraisemblable cependant qu'en l'occurence les règles habituelles sont mises en défaut, car chacune des cinq formes obtenues à l'état cristallisé par HUBBARD et WALD est transformable en toutes les autres. Cette conversion réversible exclut toute autre interprétation, si ce n'est celle d'une isomérie «cis-trans».

Lorsque la rhodopsine est exposée à la lumière, le pigment se décolore rapidement : HUBBARD et WALD ont montré que la décoloration de la rhodopsine s'accompagne de la transformation du néo-rétinène B en rétinène entièrement «trans». Il en résulte donc que, dans le cycle visuel, la stéréoisomérisation du rétinène (ou de la vitamine A) apparaît comme le phénomène fondamental des transformations de la rhodopsine.

Le schéma ci-dessous, reproduit d'après WALD *(74)*, résume l'état actuel de nos connaissances sur le cycle des transformations que subit la rhodopsine dans la rétine.



En résumé, les travaux que nous venons d'analyser ont permis d'établir définitivement la notion de l'isomérie «cis-trans» des pigments caroténoïdes. Ils ont mis en lumière que cette isomérie géométrique, d'abord constatée par HERZIG et FALTIS *(16)* dans le cas de la bixine et dont KARRER, HELFENSTEIN, WIDMER et van ITALLIE *(18)* ont, les premiers, donné une interprétation correcte, peut se présenter spontanément dans les milieux naturels. Ces mêmes travaux ont également précisé la nature des agents physiques ou chimiques et les conditions expérimentales qui permettent de provoquer artificiellement la formation de stéréoisomères. Ils ont fait apparaître que les divers caroténoïdes étudiés se comportent de façon sensiblement identique à cet égard.

Ils ont parallèlement permis la confrontation des acquisitions expérimentales et des prévisions que l'étude théorique du phénomène permettait de déduire de la structure polyénique de ces pigments.

Des règles de portée générale ont pu ainsi être dégagées, notamment en ce qui concerne les relations entre la forme de ces molécules et leurs caractères spectraux.

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

Avant de décrire nos recherches sur l'isomérisation de l'astaxanthine, nous avons tenu à rapporter les contrôles effectués sur des solutions de β-carotène.

Il était en effet souhaitable, en utilisant un matériel parfaitement défini et des techniques éprouvées, de reprendre un certain nombre d'expériences effectuées par nos devanciers.

CHAPITRE I

Isomérisation du β-carotène et de l'astaxanthine sous l'action de la chaleur et par adsorption sur alumine.

Avant d'étudier l'action de la chaleur et de l'alumine sur le β-carotène et l'astaxanthine, nous rappellerons les procédés permettant de contrôler l'activité de l'alumine employée dans nos chromatographies.

Le degré d'activité de l'adsorbant apparaît comme un caractère de première importance pour l'étude de tels phénomènes ; c'est pourquoi dans chacune de nos expériences nous avons pris soin de contrôler notre alumine à cet égard.

La technique utilisée est celle de BROCKMANN et SCHODDER *(75)* :

l'alumine est classée d'après son pouvoir adsorbant vis à vis de certains colorants organiques :

(a) Azobenzène
(b) p-méthoxyazobenzène
(c) Jaune Soudan
(d) Rouge Soudan
(e) p-aminoazobenzène
(f) p-oxyazobenzène

Les colorants sont dissous par paire (20 mg de chaque) dans 10 ml de benzène pur, et la solution est diluée avec 40 ml d'éther de pétrole anhydre.

Les différentes solutions sont les suivantes :

solution 1 = a + b
solution 2 = b + c
solution 3 = c + d
solution 4 = d + e
solution 5 = e + f

L'alumine est graduée de I à V suivant son comportement vis à vis de ces solutions.

L'échantillon à tester est tassé sur une hauteur de 5 cm dans un tube de verre ouvert à ses deux extrémités, de 10 cm sur 1,5 cm. L'extrémité inférieure du tube est obturée par une bourre de coton ; la surface de l'alumine est protégée par un disque de papier filtre.

10 ml de la solution de colorants sont versés au sommet de la colonne avec précaution ; tandis que les dernières gouttes filtrent, 20 ml d'un mélange de 1/4 de benzène et de 3/4 d'éther de pétrole sont ajoutés pour développement.

L'activité de l'alumine est alors objectivée par l'apparence fluide du chromatogramme.

ACTIVITE	I	II	III	IV	V
N° de la solution	1	1 2	2 3	3 4	5
Adsorbé sur :					
le sommet de la colonne	b	b c	c d	d e	f
le bas de la colonne ..	a	b	c	d	e
dans le filtrat		a	b	c	

Pour préparer des échantillons d'alumine d'activité variée, il convient d'opérer de la manière suivante :

l'alumine est chauffée pendant cinq heures à 400° C., en agitant constamment dans un récipient ouvert. On laisse ensuite refroidir dans un dessicateur à vide. Ceci permet d'obtenir de l'alumine de type I, la plus active. Les types II à V sont préparés en exposant le type I à une atmosphère humide : l'activité décroissant avec la quantité d'eau absorbée, on teste périodiquement un échantillon d'alumine jusqu'à ce que l'apparence du chromatogramme corresponde à la qualité requise ; celle-ci ne se modifie plus sensiblement si l'on conserve l'échantillon dans un flacon hermétiquement bouché (NICOL *(76)*).

A - ISOMERISATION DU β-CAROTENE.

Ainsi que nous l'avons indiqué ci-dessus, l'isomérisation du β-carotène a été constatée pour la première fois par GILLAM et EL RIDI *(8)* au cours d'une adsorption chromatographique sur alumine. Mais on doit à MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWIN-

GELSTEIN *(9)*, une étude systématique très complète de l'isomérisation par contact, avec des oxydes métalliques.

Si donc nous avons repris les expériences de ces auteurs, c'était avant tout pour tester nos techniques.

1°) Préparation des solutions de β-carotène.

a) dans l'éther de pétrole (*) (solution A)

10 mg de β-carotène sont dissous dans 50 ml d'éther de pétrole. 1/2 ml est prélevé étendu à 10 ml, le spectre est enregistré : λ max = 452 et 480 mμ.

b) dans le mélange à volumes égaux d'éther de pétrole et de benzène (solution B).

15 ml de la solution précédente sont additionnés de 15 ml de benzène On prélève 1/2 ml, on dilue à 10 ml et on enregistre le spectre : λ max = 458 et 488 mμ (Fig. 6, courbe a, p. 63).

c) Chromatographie de la solution B

La chromatographie révèle l'existence de traces d'α-carotène, mélangé au β-carotène entièrement «trans» (Fig. 7, p. 64).

2°) Action de la température.

25 ml de la solution B sont maintenus à la température de l'ébullition (réfrigérant à reflux) pendant 6 heures. D'importantes modifications des caractères spectraux, révèlant l'hétérogénéité de la solution, sont enregistrées (Fig. 6, courbe b, p. 63).

Chromatographie de la solution B après ébullition.

La solution est filtrée lentement. Le développement du chromatogramme avec de l'éther de pétrole additionné de méthanol dans la proportion de 1 pour 3000, fait apparaître 4 zones superposées : zones a, b, c, d (Fig. 7, p. 64).

Après avoir séché la colonne, chacune des zones est prélevée, éluée par de l'éther de pétrole, (additioné de 5 p. 100 de méthanol), lavée, séchée sur sulfate de sodium.

(*) Ether de pétrole (E = 35 - 50° C.).

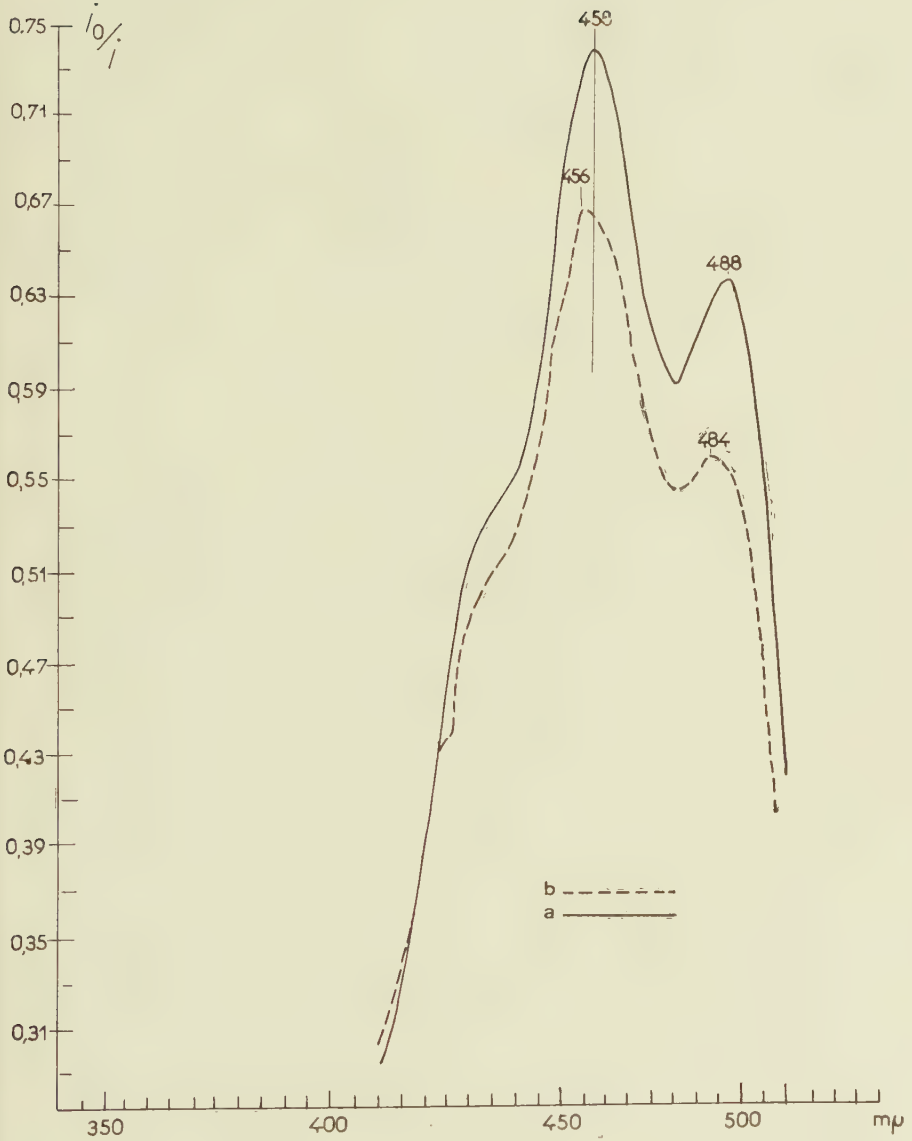


Fig. 6. — Isomérisation du β-carotène sous l'action de la chaleur : courbes d'absorption du β-carotène en solution dans éther de pétrole + benzène à volumes égaux :

a) **avant ébullition**

b) **après ébullition**

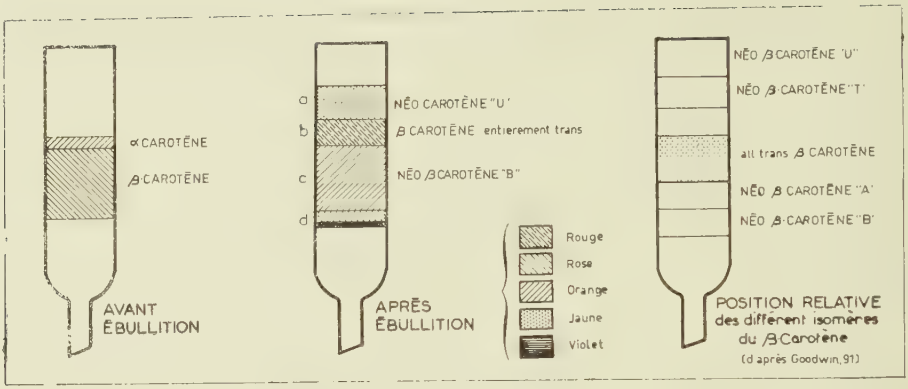


Fig. 7. — Chromatographie du β-carotène en solution dans éther de pétrole + benzène.

Les caractéristiques spectrales de chaque zone sont :

Zone a : jaune λ max = 450 - 478 mμ néo -β- carotène U

Zone c : saumon λ max = 444 - 472 mμ néo -β- carotène B

Zone d : violette λ max = 441,5-474,5 mμ néo -β- carotène D

La zone b paraissant hétérogène a été prélevée, et éluée. La solution lavée et séchée a été chromatographiée.

Le chromatogramme révèle deux zones b' et b'' dont les caractères spectraux ont été enregistrés : la zone b' (maxima d'absorption 452 - 480 mμ), composée de β-carotène entièrement «trans». La zone b'' (maxima d'absorption 448 - 476 mμ) correspond au néo-β-carotène E.

En résumé, nous constatons qu'après 6 heures d'ébullition à reflux de la solution de β-carotène «trans», il est apparu 4 nouveaux pigments qui présentent un déplacement des maxima d'absorption vers les courtes longueurs d'ondes. Leur comportement chromatographique et leurs caractères spectraux les identifient aux pigments suivants, tous antérieurement décrits par KARRER, parmi les 12 stéréoisomères du β-carotène actuellement connus.

β-carotène (entièrement «trans») :

dans E.P. (E = 65°C.) 452 - 480 mμ

néo-β-carotène U :

dans E.P. (E=65°C.) 450 - 478 mμ

néo-β-carotène B :

dans E.P. (E=65°C.) 444 - 472 mμ

néo-β-carotène D :

dans E.P. (E=65°C.) 441,5-474 mμ

néo-β-carotène E :

dans E.P. (E=65°C.) 448 -476 mμ

3°) Transformation par adsorption sur alumine.

La technique de MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN *(9)* a été adoptée : 6 mg de β-carotène entièrement trans, en solution dans 30 ml d'éther de pétrole, sont mis au contact de 2 g. d'alumine.

Après 14 jours, on prélève 1 ml de la solution surnageante, on enregistre le spectre dans l'éther de pétrole (E = 35 - 50° C.) qui révèle un «cis-peak» à 340 mμ ; on filtre la solution sur alumine et on constate l'apparition de plusieurs zones.

En résumé les résultats obtenus sont comparables à ceux décrits par les auteurs qui ont soumis à l'ébullition les solutions de β-carotène *(10) (24)*.

Par contact avec l'alumine nous avons également produit une stéréoisomérisation analogue à celle antérieurement enregistrée par MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN *(9)*.

B - ISOMERISATION DE L'ASTAXANTHINE.

Jusqu'en 1956 l'existence d'une isomérie «cis-trans» n'avait pas été démontrée dans le cas de l'astaxanthine 3-3' dihydroxy 4-4' dicéto-β-carotène, principal pigment des Crustacés (formule développée Fig. 6, p. 67).

En 1951, CHECHAN, GRANGAUD et MASSONET *(14)*, étudiant les pigments caroténoïdes de deux Crustacés Décapodes de la tribu des Peneidae, Aristeomorpha foliacea, Risso et Aristeus antennatus, Risso, constataient dans leurs extraits l'existence de plusieurs pigments voisins étroitement apparentés par leurs caractéristiques spectrophotométriques, et ils avaient émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'un mélange d'isomères géométriques de l'astaxanthine.

Plusieurs arguments plaidaient en effet dans ce sens : certains extraits présentaient une couche d'absorption avec un sommet étalé et légèrement décalé vers les courtes longueurs d'ondes par rapport à celui caractéristique de l'astaxanthine entièrement «trans», dont le spectre se présente comme une courbe en cloche avec un sommet unique à 492 mμ dans la pyridine et à 470-472 mμ dans l'éther de pétrole. Les extraits possédant un tel spectre étalé révélaient leur hétérogénéité lorsqu'on les chromatographiait sur alumine : cinq zones pouvaient être ainsi individualisées dont les courbes d'absorption avaient toutes la même allure, seul l'emplacement du sommet variant légèrement *(77)*.

Notre travail a donc eu pour premier but de rechercher si, conformément à l'hypothèse *(14) (77)*, ces pigments étaient bien des formes stéréoisomères naturelles de l'astaxanthine entièrement «trans», ou s'il s'agissait de substances chimiques voisines ?

A l'aide des techniques classiquement utilisées pour provoquer l'isomérisation artificielle des pigments caroténoïdes, nous avons cherché à provoquer la transformation de ces différentes formes les unes dans les autres.

1°) Préparation des solutions d'astaxanthine :

La technique de préparation a été celle décrite antérieurement par GRANGAUD et MASSONET *(78)* ; nous avons utilisé essentiellement comme tissu le conjonctif péristomacal qui, ainsi que l'ont montré ces auteurs, est beaucoup plus riche en pigments que l'hépato-pancréas.

Sur 2 kg d'Aristeus antennatus, la membrane conjonctive qui entoure la paroi stomacale a été prélevée et broyée avec

du sulfate de sodium anhydre, la masse a été épuisée par l'acétone (200 ml - 100 ml).

Les solutions acétoniques filtrées sont placées dans une ampoule à décanter et additionnées d'éther de pétrole (200 ml) et d'eau distillée (500 ml).

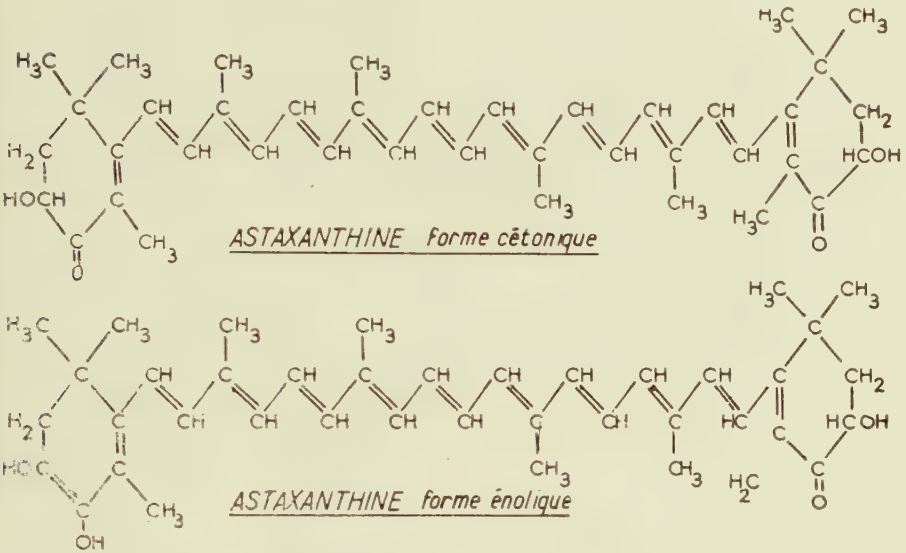


Fig. 8. — Formules développées de l'astaxanthine : forme cétonique — forme énolique

La phase légère est recueillie, lavée plusieurs fois à l'eau distillée pour éliminer l'acétone, et séchée sur sulfate de sodium anhydre.

Cette solution est alors agitée avec de l'alcool à 85° (volume égal). Après séparation des deux phases, la phase alcoolique est recueillie. Le volume d'éther est ramené à 200 ml ; et l'agitation avec de l'alcool est répétée jusqu'à obtention d'une hypophase incolore.

La phase éthéro-pétrolique est finalement lavée à l'eau distillé et séchée sur sulfate de sodium anhydre (épiphase).

Cette solution renferme les esters d'astaxanthine, mais pas d'astaxanthine libre.

Quant aux solutions alcooliques, on les mélange à 200 ml d'éther de pétrole, on ajoute de l'eau. Le pigment passe dans la phase légère qui est séparée, lavée, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre (hypophase).

Cette solution renferme l'astaxanthine libre et une partie des esters.

De nombreuses expériences ont été menées avant que les résultats ne deviennent reproductibles et interprétables.

Comme moyen d'isomérisation nous avons eu recours à l'action de la chaleur et au contact prolongé avec l'alumine. Les analyses spectrophotomètriques ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre «BECKMAN», modèle DU, les pigments étant en solution dans la pyridine, l'éther de pétrole ou l'hexane *(79) (80) (81)*.

Tableau I : Données spectrales de l'astaxanthine (forme «trans») dans différents solvants.

Pyridine	492 mμ
E.P. (E = 35-50° C.)	470 mμ
E.P. (E = 70-80° C.)	468 mμ
Mélange (E.P. (70-80°) benzène R.P.)	474 mμ
Hexane	470 mμ
Cyclohexane	468 mμ

2°) Action de la température :

α) Sur le pigment épiphasique en solution éthéro-pétrolique

Une chromatographie du pigment épiphasique de conjonctif péristomacal est faite au départ, montrant une zone unique avec un sommet à maximum à 488 mμ dans la pyridine, 466 mμ dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.), 464 mμ dans l'éther de pétrole (E = 70-80° C.).

195 ml d'extrait en solution éthéro-pétrolique (E = 70-80° C.) sont additionnés de 195 ml de benzène. On en prélève 5 ml dont on enregistre le spectre (λ max = 470 mμ). Les 385 ml du mélange sont placés dans un ballon surmonté d'un réfri-

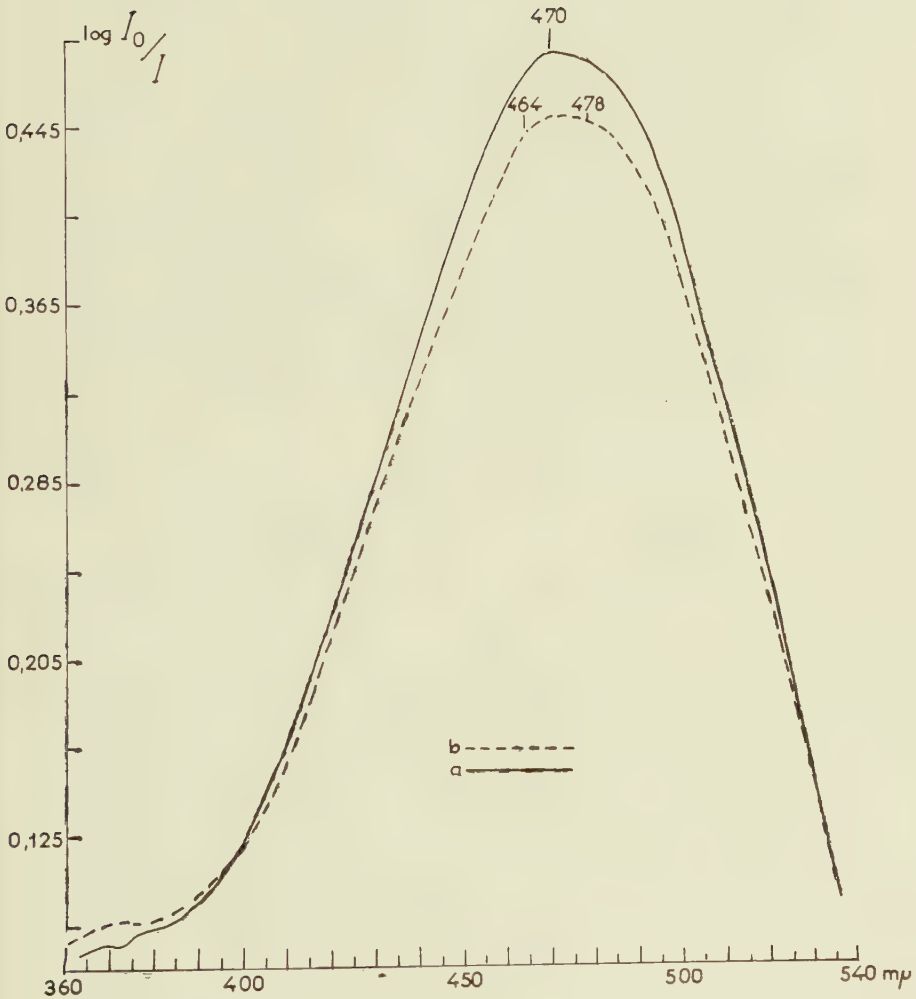


Fig. 9. — Isomérisation de l'astaxanthine sous l'action de la chaleur : courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans éther de pétrole + benzène :

a) avant ébullition

b) après ébullition

gérant à reflux et portés à ébullition pendant 5 heures, suivant la méthode de CARTER et GILLAM *(24)*.

Après ébullition on constate un étalement du spectre avec maximum en plateau entre 464 - 478 mμ (Fig. 9, p. 69).

La chromatographie sur l'alumine révèle l'hétérogénéité pigmentaire : avant développement plusieurs zones apparaissent déjà.

Le développement est effectué avec divers mélanges d'éther de pétrole et de méthanol. On fait passer d'abord le mélange à 1 p. 2000 de méthanol, puis 10 ml du mélange à 1 p. 1000, de nouveau 1 p. 2000 et pour finir 1 p. 4000. Après lavage avec de l'éther de pétrole pur (E = 35-50° C.) et après avoir séché la colonne, chaque zone est recueillie dans ce solvant et leurs spectres respectifs sont enregistrés. Cinq zones se trouvent ainsi individualisées (Fig. 10, P. 70) les spectres révélant pour chacune d'elles un maximum unique situé respectivement à 470, 468, 460, 458 et 456 mμ dans l'éther de pétrole.

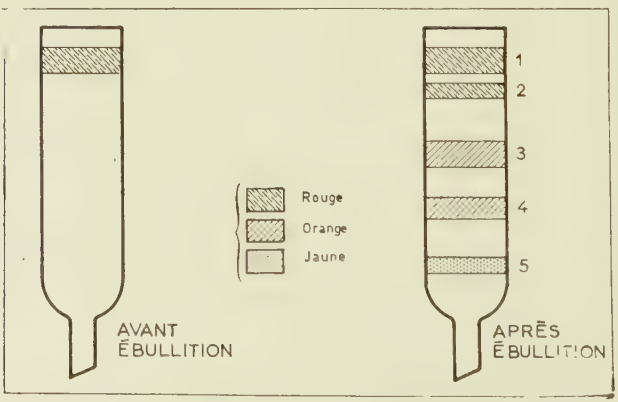


Fig. 10. — Chromatographie du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans éther de pétrole + benzène

En outre le liquide ayant filtré à travers la colonne d'alumine étant coloré, son spectre a été enregistré (λ max = 450 mμ dans l'éther de pétrole).

Tableau II : Isomérisation de l'astaxanthine épiphasique en solution dans éther de pétrole + benzène, après cinq heures d'ébullition :

Tableau récapitulatif :

---

spectre global avant ébullition :

dans E.P. (E=70-80° C.) . . . . . λ max 464 mμ

dans E.P. (E=35-50° C.) . . . . . λ max 466 mμ

dans la pyridine . . . . . λ max 488 mμ

mélange E.P. + benzène . . . . . λ max 476-478 mμ

spectre global après ébullition :

dans E.P. (E=70-80° C.)
(spectre étalé) . . . . . λ max entre 460-474 mμ

dans E.P. (E=35-50° C.)
(spectre étalé) . . . . . λ max entre 455-470 mμ

dans la pyridine (spectre étalé) . . λ max entre 476-492 mμ

mélange E.P. + benzène
(spectre étalé) . . . . . λ max entre 470-480 mμ

Zone 1 dans la pyridine . . . . . λ max 492 mμ

Zone intermédiaire dans la pyridine λ max 484 mμ

Zone 2 (éluable au méthanol) dans
E.P. . . . . λ max 468 mμ

dans la pyridine . . . . . λ max 488 mμ

Zone 3 (éluable au méthanol) dans
E.P. . . . . λ max 456 mμ

Zone 4 dans la pyridine . . . . . λ max 484 mμ

Zone 5 dans la pyridine . . . . . λ max 482 mμ

Pigment non retenu sur le chromatogramme dans E.P. . . . . λ max 450 mμ

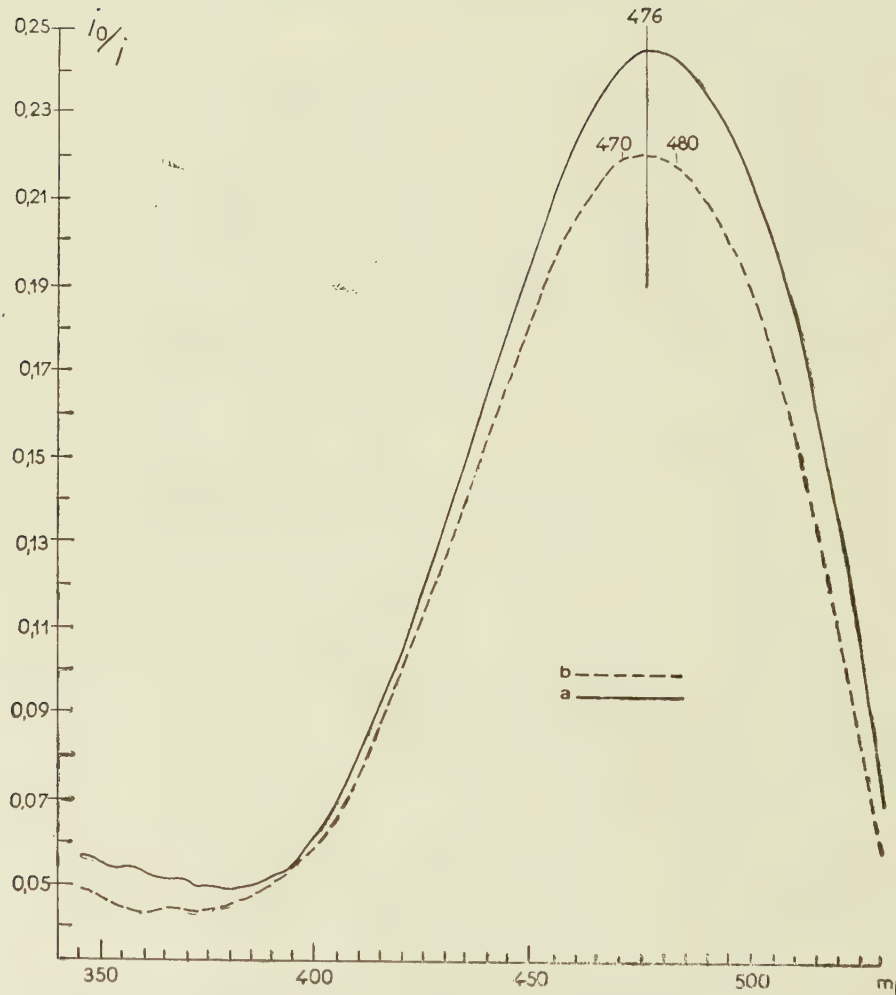


Fig. 11. — Isomérisation de l'astaxanhine sous l'action de la chaleur : courbes d'absorption du pigment hypophasique de l'astaxanthine en solution dans éther de pétrole + benzène à volume égaux :

a) avant ébullition

b) après ébullition

b) Sur le pigment hypophasique en solution dans l'éther de pétrole.

La chromatographie de la solution éthéro-pétrolique du pigment hypophasique montre sur alumine une zone unique avec un spectre à maximum d'absorption à 492 mμ dans la pyridine, 470 mμ dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.).

175 ml de solution éthéro-pétrolique sont additionnés de 175 ml de benzène et versés dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux que l'on porte à l'ébullition pendant 5 heures. La solution, d'abord rouge orangée devient progressivement plus jaune : effectivement le spectre est plus étalé avec maximum déplacé vers les courtes longueurs d'ondes et en plateau

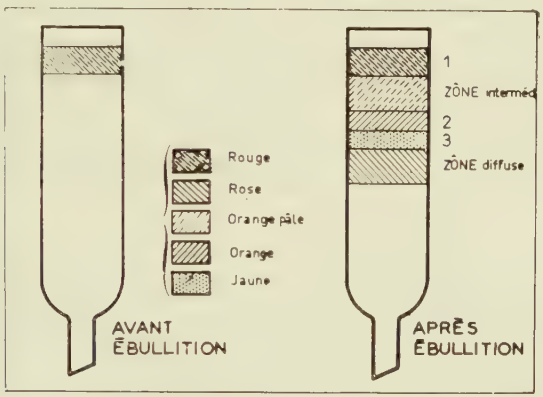


Fig. 12. — Chromatographie du pigment hypophasique de l'astaxanthine en solution dans éther de pétrole + benzène.

entre 470 et 480 mμ (Fig. 11, p. 72). La chromatographie fait apparaître plusieurs zones après développement avec de l'éther de pétrole additionné de méthanol (1 p. 1000, 1 p. 2000, 1 p. 4000 v/v). La colonne est lavée à l'éther de pétrole pur (E = 35-50° C.), puis séchée. Les différentes zones sont recueillies dans de l'éther de pétrole.

La zone 1, non éluable au méthanol, l'a été en partie par l'acide acétique ; elle présente un maximum d'absorption à 468 mμ dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.).

La zone 2 a un comportement à peu près semblable : après élution par l'acide acétique, on a obtenu un pigment qui, dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.), présente un maximum d'absorption à 470 mμ.

La zone 3 est éluée au méthanol : son spectre présente un maximum d'absorption à 456 mμ dans l'éther de pétrole. L'alumine de cette zone, restée rose après le traitement au méthanol, libère par action de l'acide acétique, un pigment qui a les mêmes caractéristiques que celui de la zone 1.

Enfin, le pigment de la zone 4 est éluable par le méthanol : son spectre dans l'éther de pétrole a un maximum à 464 mμ.

c) Sur le pigment épiphasique en solution dans l'hexane.

La technique de préparation de la solution du pigment épiphasique a été identique à celle décrite ci-dessus, mais l'éther de pétrole a été remplacé par de l'hexane. Avant de porter la solution à ébullition le spectre a été enregistré : courbe d'absorption à maximum unique bien accusé situé à 466 mμ (Fig. 13, p. 75).

200 ml de la solution dans l'hexane sont portés à ébullition à reflux, pendant des temps différents variant de 30 minutes à 7 heures. Les spectres ont été enregistrés : après 30 minutes, il n'y a pas de changement appréciable ; au bout de 60 minutes, la transformation se manifeste essentiellement par un étalement de la courbe d'absorption avec maxima en plateau entre 464 et 470 mμ. Cette modification s'accentue avec le temps ; mais après 6 heures d'ébullition un équilibre apparait. La solution a été chromatographiée après 7 heures d'ébullition et 5 jours à la température du laboratoire.

Le développement fait apparaître plusieurs zones : chaque zone est prélevée suivant la technique habituelle. La zone 1 est éluée, en partie, au méthanol car l'alumine reste colorée en rouge brique. La partie éluable au méthanol ainsi que le résidu traité par l'acide acétique ont un maximum d'absorption à 470 mμ dans l'hexane. Les zones 3 et 5, éluables au méthanol présentent les mêmes caractéristiques spectrales.

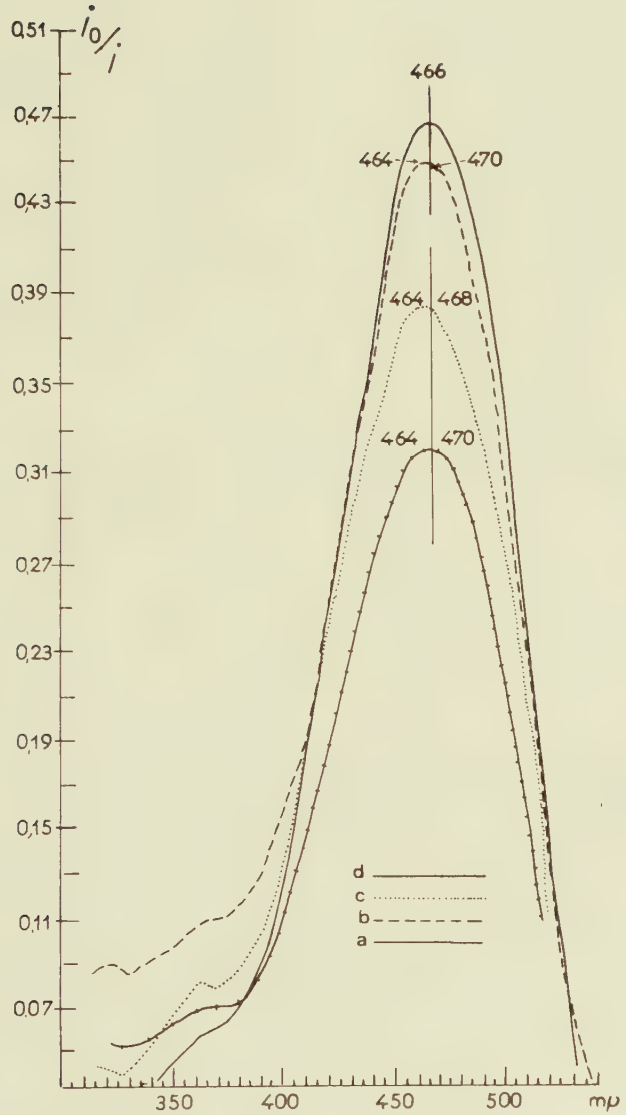


Fig. 13. — Isomérisation de l'astaxanthine sous l'action de la chaleur : courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'hexane :

a) **avant ébullition**
b) **après 1 heure d'ébullition**
c) **après 4 heures d'ébullition**
d) **après 5 heures d'ébullition**

Tableau III : Isomérisation de l'astaxanthine épiphasique en solution dans l'hexane ; après 30 minutes à 7 heures d'ébullition.

Spectre initial avant ébullition	dans l'hexane	λ max 466 mμ
Spectre après 30 minutes d'ébullition	Pas de changement appréciable	
Spectre après 60 minutes d'ébullition	Courbe d'absorption en plateau entre	324 et 334 mμ 362 et 366 mμ 370 et 374 mμ
	Sommet étalé entre	464 et 470 mμ
	avec λ max. à	466 mμ
Spectre après 2 heures d'ébullition	Courbe d'absorption en plateau entre	362 et 372 mμ
	Maximum d'absorption à	466 mμ
Spectre après 3 heures d'ébullition et après une nuit à la température du laboratoire	Ebauche de « cis-peak »	354 mμ
	Courbe d'absorption en plateau entre	362 et 376 mμ
	Sommet étalé entre	464 et 470 mμ
Spectre après 4 heures d'ébullition et après 24 heures à la température du laboratoire	Ebauche de « cis-peak »	330 mμ
	Courbe d'absorption en en plateau entre	362 et 376 mμ
	Sommet étalé entre	464 et 468 mμ
Spectre après 5 heures d'ébullition et après 24 heures à la température du laboratoire	Ebauche de « cis-peak »	328 mμ
	Courbe d'absorption en en plateau entre	364 et 372 mμ
	Sommet étalé entre	458 et 468 mμ
Spectre après 7 heures d'ébullititon et après 5 jours à la température du laboratoire	Pas de changement appréciable	
Chromatographie	Zone 1 a) Partie éluable au méthanol λ max à	470 mμ
	b) Partie éluable à l'acide acétique λ max à	470 mμ
	Zone 3 Eluable au méthanol λ max à	462 mμ
	Zone 5 Eluable au méthanol λ max à	458 mμ

3°) Transformation en fonction du temps :

a) Sur le pigment épiphasique en solution dans l'éther de pétrole.

10 ml de la solution épiphasique de conjonctif péristomacal d'Aristeus ont été abandonnés 20 jours à 4° C. à l'obscurité, en vase clos. Des modifications spectrales comparables à celles produites par la chaleur ont été enregistrées (maximum d'absorption étalé entre 456 et 474 mμ dans l'éther de pétrole, courbe b, Fig. 14 p. 78).

La chromatographie a révélé quatre constituants :

- une zone 1 avec maximum d'absorption à 470 mμ
- une zone 2 avec maximum d'absorption à 466 mμ
- une zone 3 avec maximum d'absorption à 462 mμ
- une zone 4 avec maximum d'absorption à 460 mμ

dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.).

b) Sur le pigment épiphasique en solution dans l'hexane.

Le pigment épiphasique en solution dans l'hexane a été préparé de la même façon que dans l'expérience précédente :

25 ml de la solution ont été abandonnés en vase clos à 4° C. Après 5 jours, puis après 9 jours, nous en avons prélevé 0,5 ml et avons enregistré les spectres. Des modifications spectrales très nettes ont été notées :

- initialement, nous obtenions un maximum unique, bien accusé à 466 mμ.

- après 5 et 9 jours, le maximum est étalé entre 462 et 470 mμ (courbe b, Fig. 15, p. 79).

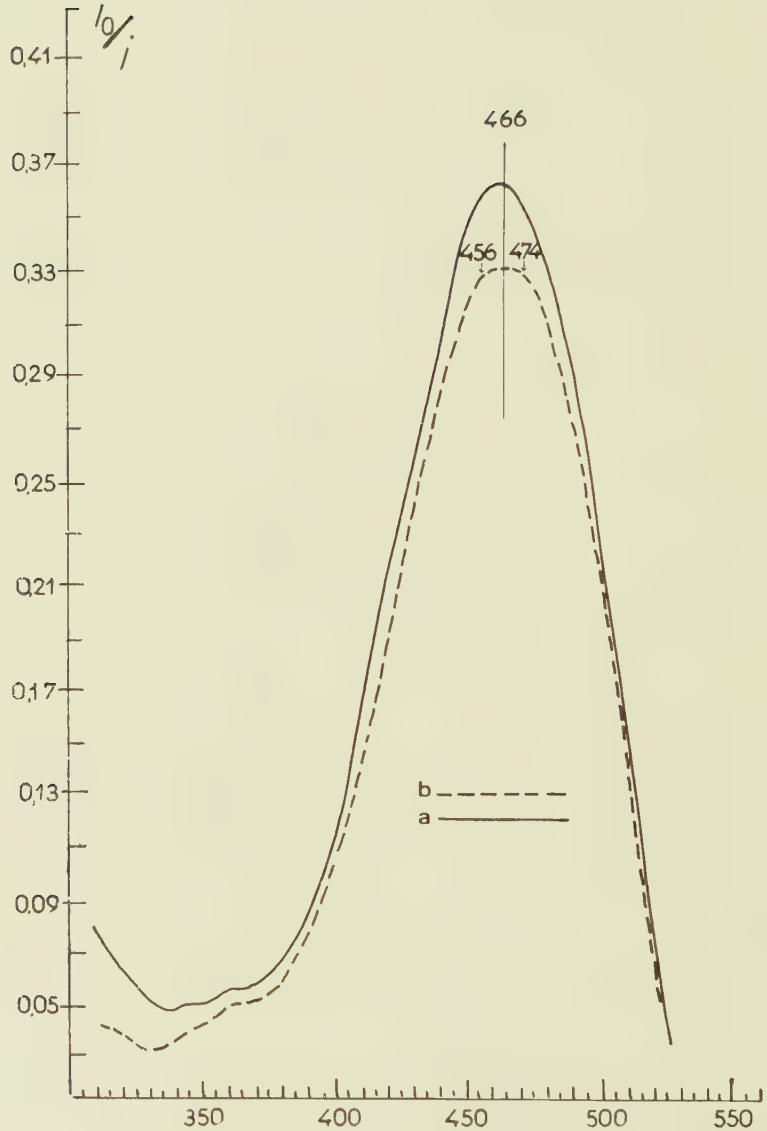


Fig. 14. — Isomérisation de l'astaxanthine en fonction du temps : courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'éther de pétrole :

a) spectre initial

b) après 20 jours à 4° C.

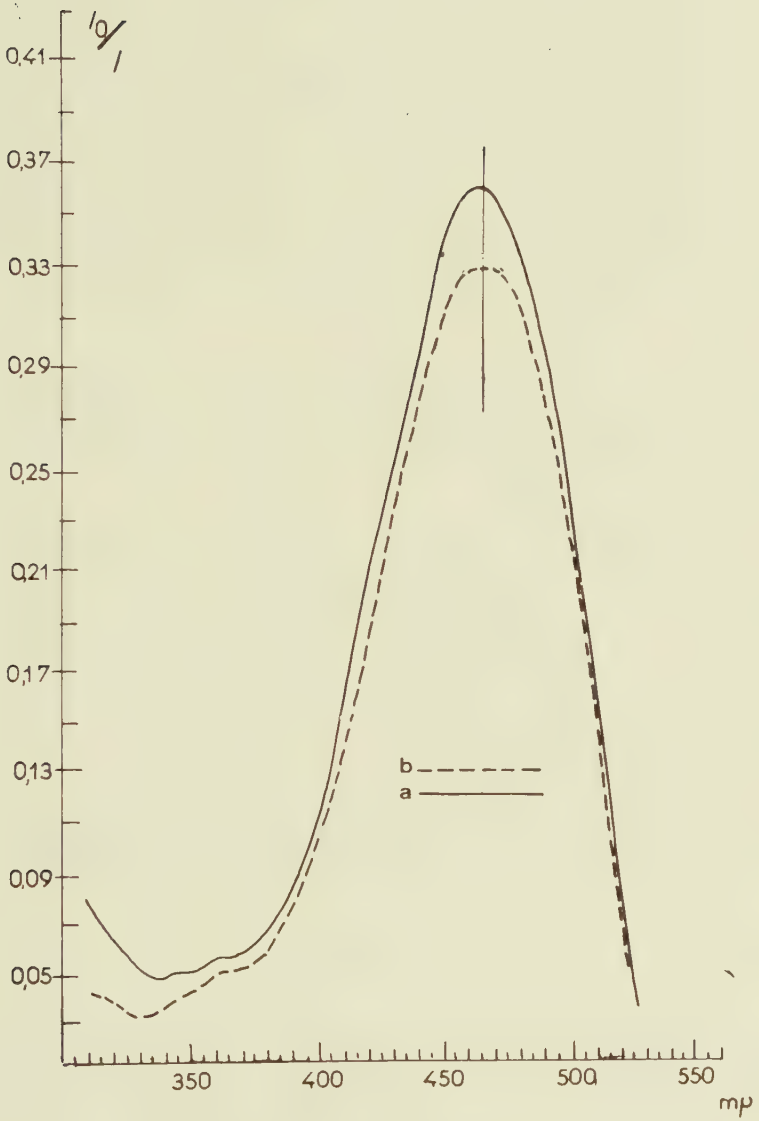


Fig. 15. — Isomérisation de l'astaxanthine en fonction du temps : courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'hexane :

a) spectre initial

b) après 9 jours à 4° C.

4°) Transformation par adsorption sur alumine.

a) Sur le pigment épiphasique en solution dans l'éther de pétrole.

Le pigment en solution dans l'éther de pétrole est chromatographié et développé comme il a été indiqué précédemment. Nous obtenons quatre zones.

La zone 1 est éluée au méthanol, lavée et séchée sur sulfate de sodium anhydre. Une nouvelle chromatographie donne après développement deux zones 1' et 2', dont les maxima se situent respectivement à 468 et 464 mμ dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.).

Le traitement par le méthanol n'arrive pas à extraire la totalité du pigment retenu sur alumine. Après l'avoir abandonné 48 heures à l'obscurité et à froid, il devient partiellement éluable au méthanol, (solution R_1) ; le résidu est éluable à l'acide acétique, (solution R_2).

La solution R_1 est chromatographiée. Après développement avec de l'éther de pétrole additionné de méthanol dans les proportions de 1 p. 2000, 1 p. 4000, 1 p. 2000, puis 1 p. 1000 ; on obtient cinq zones distinctes dont l'une disparaît d'ailleurs très rapidement, ce qui révèle la présence d'un pigment très labile. A la fin du développement, on obtient donc quatre zones : R^{S1}, R^{S2}, R^{S3}, R^{S4} (Fig. 16, p. 81).

R^{S1}, non éluable au méthanol, l'est à l'acide acétique et présente un maximum à 468 mμ dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.) et à 490 mμ dans la pyridine.

R^{S2} non éluable au méthanol, l'est à l'acide acétique et son sommet dans l'éther de pétrole est à 450 mμ.

R^{S3} n'est que partiellement éluable, la partie éluable est lavée, puis séchée sur sulfate de sodium anhydre. Le pigment s'adsorbe immédiatement sur le sulfate de sodium qui se colore en rose ; une trace de méthanol suffit à le «décrocher». Il présente un maximum à 454 mμ dans l'éther de pétrole.

La partie non éluable abandonnée sur alumine pendant 48 heures le devient alors et montre un maximum à 472 mμ dans l'éther de pétrole.

Enfin R^{S4}, facilement éluable au méthanol, a un maximum à 460 mμ dans l'éther de pétrole et 482 mμ dans la pyridine.

La solution R_2 présente un maximum bien net à 470 mμ dans l'éther de pétrole (E = 35-50° C.) et à 492 mμ dans la pyridine ; il s'agit donc de l'astaxanthine entièrement «trans». La solution éthéro-pétrolique est filtrée sur alumine ; on surmonte la colonne d'éther de pétrole et on laisse en contact pendant 18 heures. Au bout de ce temps le chromatogramme est développé avec de l'éther de pétrole additionné de 1 p. 2000 de méthanol : cinq zones sont ainsi révélées.

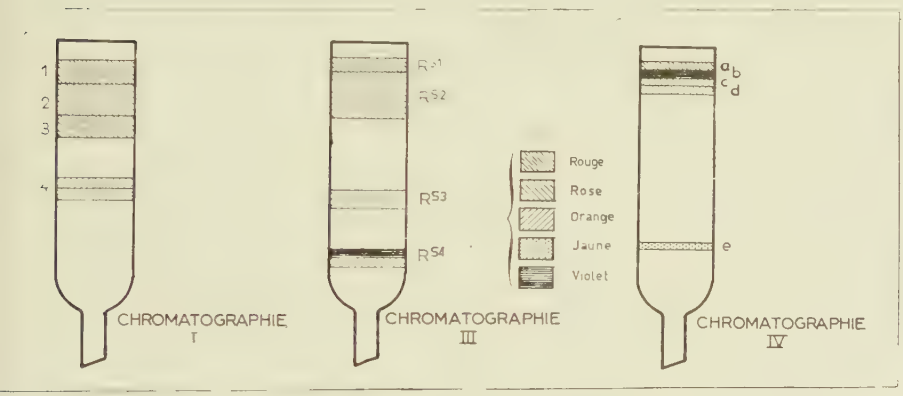


Fig. 16. — Chromatographie du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'éther de pétrole, avant et après transformation par adsorption sur alumine.

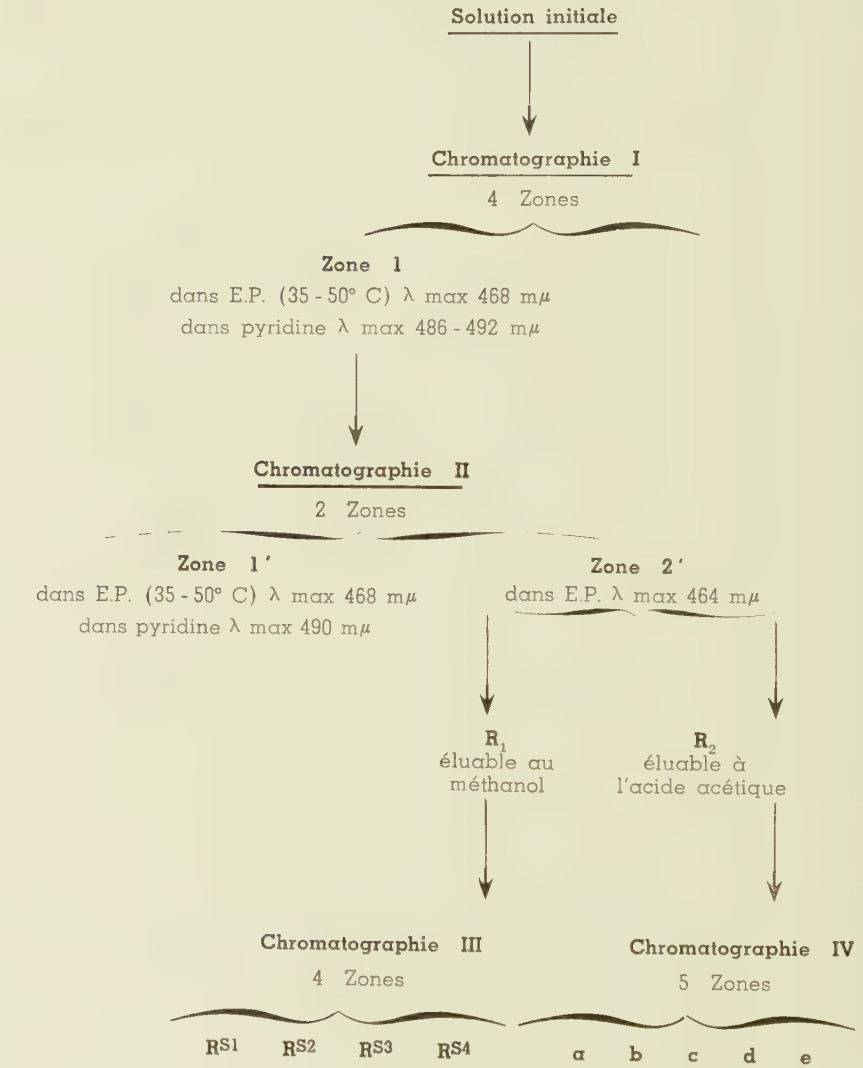
Leurs caractères respectifs sont les suivants :

la zone a n'est pas directement éluable : elle le devient partiellement au bout de quatre heures ; son spectre présente un maximum d'absorption entre 466 et 470 mμ.

la zone c, difficilement éluable au méthanol, présente un maximum à 466 mμ.

les zones b, d et e n'ont pu être isolées.

Tableau IV : Isomérisation de l'astaxanthine épiphasique en solution éthéro-pétrolique par adsorption sur alumine.



b) Sur le pigment épiphasique en solution dans l'hexane.

Nous avons reproduit le protocole expérimental utilisé par MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN *(9)* pour le β-carotène et le lycopène. 30 ml de la solution épiphasique dans l'hexane (λ max 466 mμ) sont abandonnés à l'obscurité et à la température du laboratoire en présence de 2 g d'alumine. On agite à plusieurs reprises par retournement.

Après des contacts de 5 ou 8 jours, une partie seulement du pigment a pu être éluée par le méthanol. Son comportement spectral diffère du spectre intial par un abaissement de la densité optique, un étalement de la courbe et une ébauche de «cis-peak» vers 330 mμ.

Ces résultats sont superposables à ceux obtenus lors de l'étude de l'isomérisation de l'astaxanthine par ébullition à reflux (cf. expériences précédentes).

Tableau V : Isomérisation de l'astaxanthine épiphasique en solution dans l'hexane après adsorption sur alumine : tableau récapitulatif.

Spectre initial			λ max 466 mμ
Après 5 jours de contact sur alumine	a) Partie éluable au méthanol	ébauche de « cis-peak » . .	λ max 330 mμ
		Courbe d'absorption en plateau entre	λ 452 - 454 mμ
			λ 456 - 466 mμ
	b) Partie éluable à l'acide acétique	Courbe d'absorption en plateau entre	λ 342 - 366 mμ
			λ 460 - 462 mμ
		Sommet	λ 464 mμ
		Sommet étalé entre	λ 466 - 472 mμ
Après 8 jours de contact sur alumine	a) Partie éluable au méthanol	ébauche de « cis-peak » . .	λ 332 mμ
		Sommet étalé entre	λ 450 - 458 mμ
	b) Partie éluable à l'acide acétique	Courbe d'absorption en plateau entre	λ 456 - 458 mμ
			λ 460 - 468 mμ

CHAPITRE II

Action des radiations sur le β-carotène, la xanthophylle et l'astaxanthine.

Le développement de la technique de production des particules élémentaires a donné, depuis quelques années une forte impulsion à la Chimie des Rayonnements.

Leur action sur l'eau et diverses substances chimiques a fait l'objet d'importants travaux ; ceux-ci ont montré la complexité de la plupart des phénomènes chimiques observés et ont conduit à diverses interprétations : en effet, des réactions de nature très différente et souvent antagoniste ont été mises en évidence : réduction ou oxydation, synthèse ou dégradation, polymérisation *(82) (83) (84) (85) (86) (87) (88)*.

La Chimie des Radiations, comme l'a remarqué HAISSINSKY *(89)* «se développe en profondeur, s'étend aussi en surface et englobe de nouveaux domaines qui posent de nouveaux problèmes».

Il a souligné également que «le succès de son futur développement dépend en large partie des contacts de plus en plus étroits qui seraient établis entre elle et les sciences voisines. Ceux-ci pourraient parfois prendre le caractère d'une coopération directe entre le radio-chimiste et le physicien, le photochimiste et le médecin ou le biologiste, entre l'expérimentateur et le théoricien».

En prolongement de notre travail sur l'isomérisation des caroténoïdes et plus particulièrement de l'astaxanthine dont les résultats ont été rapportés dans les chapitres antérieurs, il nous a paru intéressant d'amorcer une étude de l'action des radiations sur ces mêmes pigments ; comme énergie radiante, nous avons utilisé soit les neutrons, soit les rayons γ.

Ces essais ont porté sur le β-carotène lui-même, la xanthophylle et l'astaxanthine. Par irradiation du β-carotène et de la xanthophylle, nous avons observé un phénomène qui paraît intéressant mais d'interprétation difficile : une augmentation de l'absorption pour certaines doses d'énergie radiante sans déplacement du maximum d'absorption. Pour l'astaxanthine, au contraire, nous avons immédiatement obtenu des résultats superposables à ceux mentionnés dans les pages précédentes ;

c'est donc essentiellement vers ces expériences que s'est concentré notre effort, ce qui ne signifie pas que nous jugeons de moindre intérêt les observations faites sur le β-carotène et la xanthophylle ; nous pensons au contraire qu'elles méritent d'être renouvelées et poursuivies.

Le rayonnement γ nous ayant montré rapidement qu'il provoquait une isomérisation de l'astaxanthine, nous n'avons pratiquement utilisé ensuite que cette seule source pour des raisons de commodités expérimentales afin de reproduire le phénomène. Si ces résultats apparaissent donc comme fragmentaires et incomplets, il nous a cependant paru nécessaire de les consigner dès maintenant en raison de la possibilité de confrontation avec ceux antérieurement obtenus avec des moyens entièrement différents.

A - Action des neutrons sur le β-carotène.

Protocole expérimental.

1°) Description de l'appareil :

L'accélérateur d'ions utilisé est celui de l'Institut d'Etudes Nucléaires d'Alger.

C'est un accélérateur SAMES de 600 kv-H et de 500 μA qui comprend (Fig. 17 et 18, p. 88 et 89) :

a) un générateur électrostatique haute tension et une résistance de protection en cas d'amorçage dans le tube accélérateur.

b) l'accélérateur proprement dit avec la source d'ions, son système de vide, la cible.

c) le pupitre de commande à distance relié au générateur haute tension et à l'accélérateur par des gaines basse tension.

a) Le générateur électrostatique haute tension : le générateur est du type SAMES : il se présente sous l'aspect d'un appareil compact dont aucune pièce haute tension n'est à portée des opérateurs.

Tous les organes «haute tension» comprennent les circuits électroniques indispensables à l'excitation, la régulation, la commande et les mesures. Sans insister sur les caractéristiques

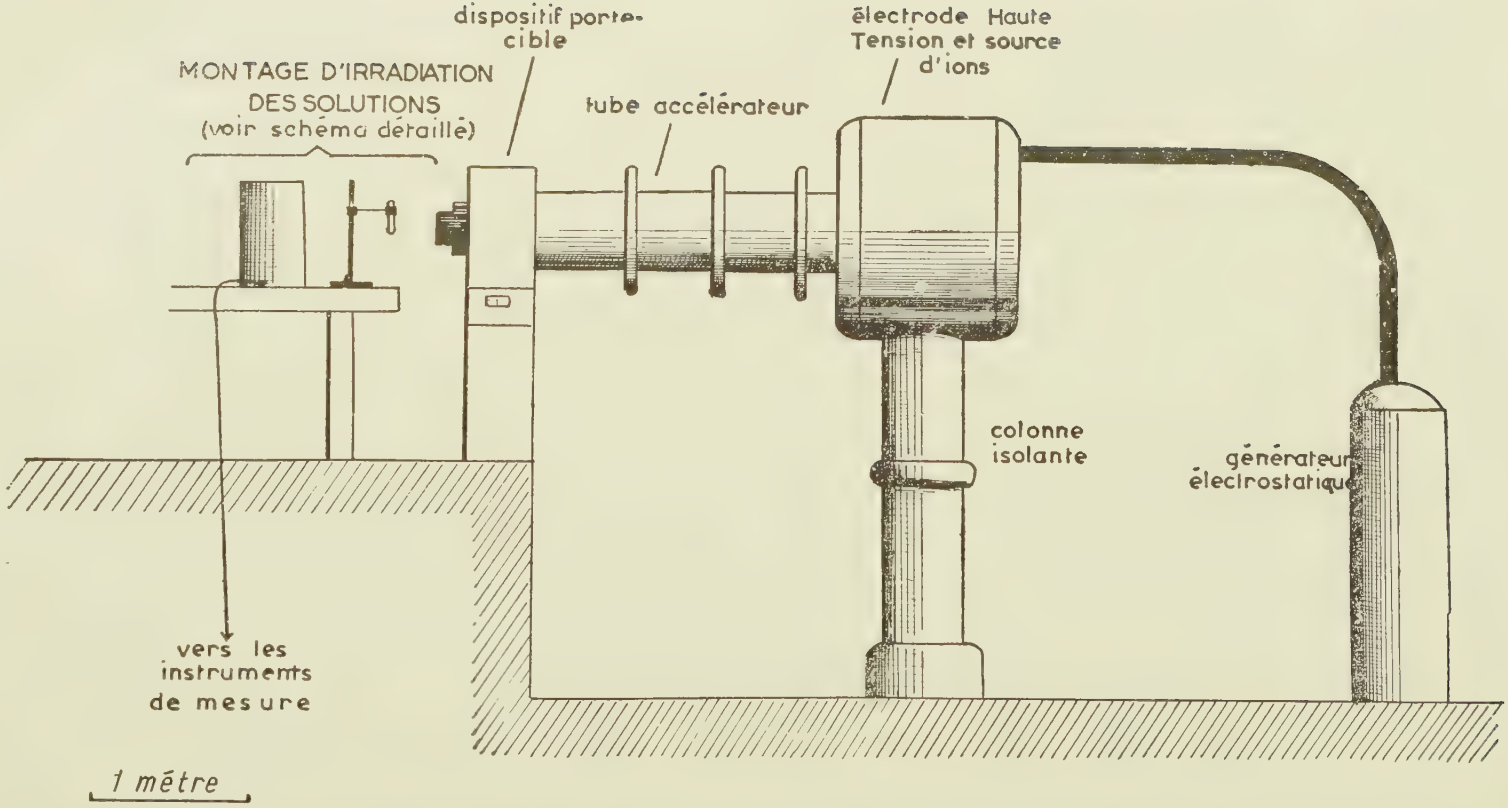


Fig. 17. — Vue latérale schématique de l'accélérateur d'ions SAMES.

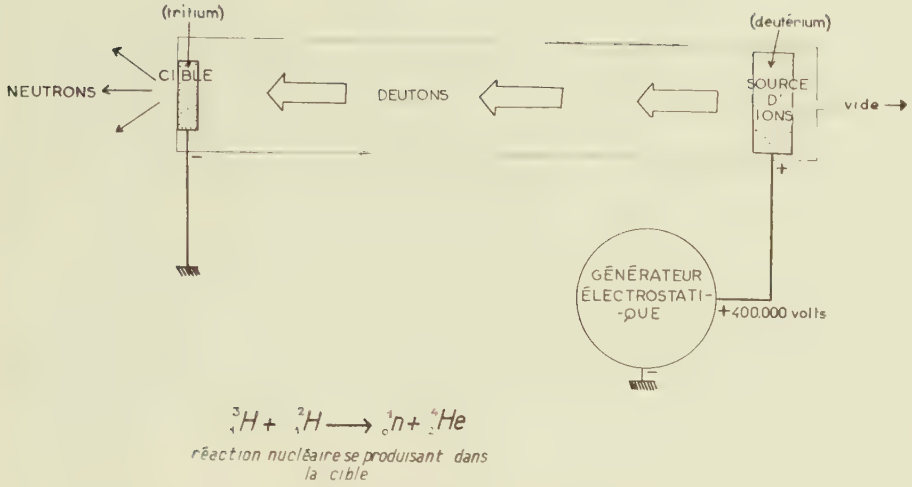


Fig. 18. — Principe du fonctionnement de l'accélérateur d'ions SAMES.

du générateur, il n'est pas inutile de rappeler que les générateurs électrostatiques SAMES du type à «transporteur isolant» réalisent la conversion directe d'une énergie mécanique en énergie électrique, sous forme de haute tension continue grâce au transfert de charges dans un champ électrique.

L'élément générateur proprement dit comporte trois organes essentiels :

1) le rotor, cylindre creux en matériau isolant, à la surface duquel les charges électriques se fixent ; ce rotor entraîné par un moteur (généralement électrique) assure le transfert des charges dans le champ : c'est la seule pièce en mouvement du générateur.

2) les ioniseurs qui créent et déposent (ioniseurs de charge), puis comptent (ioniseurs de débit) les charges électriques transportées à la surface du rotor, sont constitués par des lames métalliques, dont la tranche extrêmement fine vient se placer suivant une génératrice du rotor et à une distance très faible de celui-ci.

3) les inducteurs font apparaître sur l'arrête vive des ioniseurs le champ électrique intense nécessaire à leur fonction-

nement, fixant les charges produites sur le rotor (inducteurs d'excitation) ou au contraire les retirant (inducteurs de débit).

Ces inducteurs, en fait, se trouvent «effacés» derrière un cylindre en matériau très légèrement conducteur (verre spécial) qui leur permet de jouer leur rôle tout en évitant les concentrations locales du champ électrique.

Le rotor passe alternativement en face d'ioniseurs de charge et de débit, où il se trouve respectivement chargé, puis déchargé. Ces opérations peuvent avoir lieu une ou plusieurs fois par tour, selon le nombre de pôles du générateur. Ce nombre de pôles correspond au nombre d'ioniseurs (ou d'inducteurs qui leur font face répartis autour du rotor).

b) L'accélérateur :

Il comprend

un système de vide
un tube accélérateur
une électrode haute tension et une source d'ions
un dispositif porte-cible

— le tube accélérateur est du type à plusieurs étages à lentilles électrostatiques. La répartition du potentiel est assurée par un diviseur à résistance, à débit relativement élevé (500 μA environ).

— l'électrode haute tension est constituée par un carter métallique poli, contenant la source d'ions et ses accessoires. La source d'ions est du type haute fréquence à couplage capacitif ; elle est susceptible de débiter un faisceau d'ions correspondant à un courant de 0,5 milliampère et est prévue pour fonctionner soit avec de l'hydrogène, soit avec du deutérium.

— le dispositif porte-cible comprend :

le porte-cible, un piège à électrons secondaires destiné à limiter la remontée des électrons secondaires vers la haute tension, un quartz escamotable pour visualiser le faisceau, un diaphragme, et une trompe escamotable permettant le changement de cible sans avoir à détruire le vide dans le tube accélérateur.

c) Le pupitre de commande :

Il est présenté sous forme de pupitre bureau groupant tous les organes de commande et de contrôle. Il est relié d'une part au générateur électrostatique, d'autre part au tube accélérateur par des cables exclusivement basse tension, se raccordant au moyen de fiches multiples.

Le pupitre de commande doit être installé dans un local autre que celui de l'accélérateur. L'alimentation générale de l'installation se fait à partir d'un réseau triphasé 50 Hz 127-220 v. La puissance totale absorbée n'excéde pas 10 KvA (dont 4,5 KvA absorbés en permanence pour le maintien du vide).

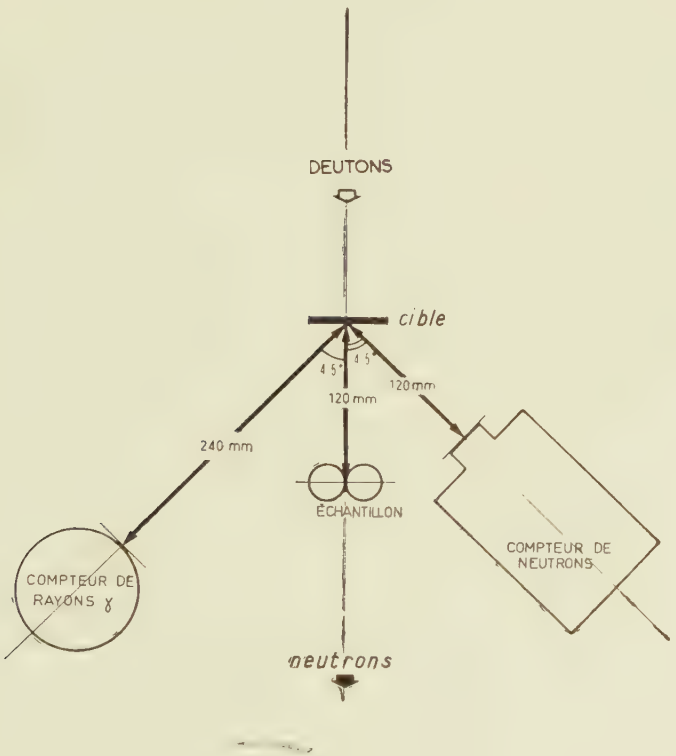


Fig. 19. Schéma du montage pour irradiation par neutrons.

Les deutons projectiles sont produits à partir du deutérium ionisé ; la cible était en tritium et nous avons obtenu des neutrons monoénergétiques de 15 MeV.

$$\underset{\text{tritium}}{{}^{3}_{1}H} + \underset{\text{deutons}}{{}^{2}_{1}H^{+}} \longrightarrow {}^{1}_{0}n + \underset{\text{Hélium ionisé}}{{}^{4}_{2}He^{++}}$$

La tension accélératrice était de 400 kv sous 900 μA à vide et 500 μA en charge ; l'énergie à la sortie du faisceau était de 28 μA et il y avait 1000 chocs par seconde après 60 secondes ; il y a émission de 80 milliroentgens/heure de rayons γ (Fig. 19, p. 91).

*
**

2°) Préparation de la solution de β-carotène.

Le β-carotène (*) a été mis en solution dans le cyclohexane (**) à la concentration de 3 γ p. ml. Des volumes de 15 ml ont été placés dans des tubes de verre ordinaire de 16 mm de diamètre munis de bouchons de liège.

La surface était donc de 2 cm^2 ; le nombre de chocs par seconde reçus par l'échantillon était de :

$1000 \times 12 = 12.000$; ce qui correspond, l'énergie des neutrons étant de 15 MeV, à $24{,}03.\ 10^{-13}$ joules.

Les solutions se trouvaient à 120 mm de la cible (Fig. 19, p. 91) pour chaque irradiation, un tube témoin ne contenant que le solvant a été placé à côté de la solution examinée.

Les temps d'exposition ont varié de 2 en 2 minutes entre 4 et 18 minutes, le spectre du β-carotène dans le cyclohexane a été enregistré avant chaque irradiation (maxima d'absorption à 454 mμ et 482 mμ).

*
**

3°) Etude spectrophotométrique.

Les enregistrements spectrophotométriques ont été effectués à l'aide du spectrophotomètre Beckman, modèle DU.

(*) β-carotène Hoffmann la Roche.
(**) Cyclohexane Prolabo ref. 23.223.

L'examen des courbes (p. 94) ne révèle pas de modification de l'allure générale du spectre, sauf un étalement discret du sommet principal de l'échantillon irradié pendant 10 minutes.

La chromatographie a d'ailleurs démontré l'hétérogénéité provoquée par l'énergie radiante : deux constituants ont pu être révélés par chromatographie sur alumine (*).

Il s'agissait de constituants particulièrement labiles qui n'ont pu être isolés . Mais l'ensemble des résultats a permis d'enregistrer un phénomène inatttendu : une forte augmentation de la densité optique pour certains des échantillons ; celui pour lequel le phénomène est le plus accentué est précisément l'échantillon ayant subi une irradiation de dix minutes (Fig. 20, p. 94).

Sans qu'il soit possible de donner dès maintenant une interprétation claire du phénomène, il parait logique d'admettre que l'irradiation a eu pour effet d'augmenter dans la molécule polyénique le nombre de niveaux de même énergie.

B) Action du rayonnement γ sur le β-carotène et la xanthophylle.

L'action du rayonnement γ a été étudiée sur des solutions de β-carotène, de xanthophylle et d'astaxanthine dans le cyclohexane.

La mise au point du protocole expérimental a été faite essentiellement sur des solutions de β-carotène et de xanthophylle (**).

(*) Alumine Merck d'activité I selon Brockmann.

(**) Xanthophylle « Nutrition Biochemicals Corporation »

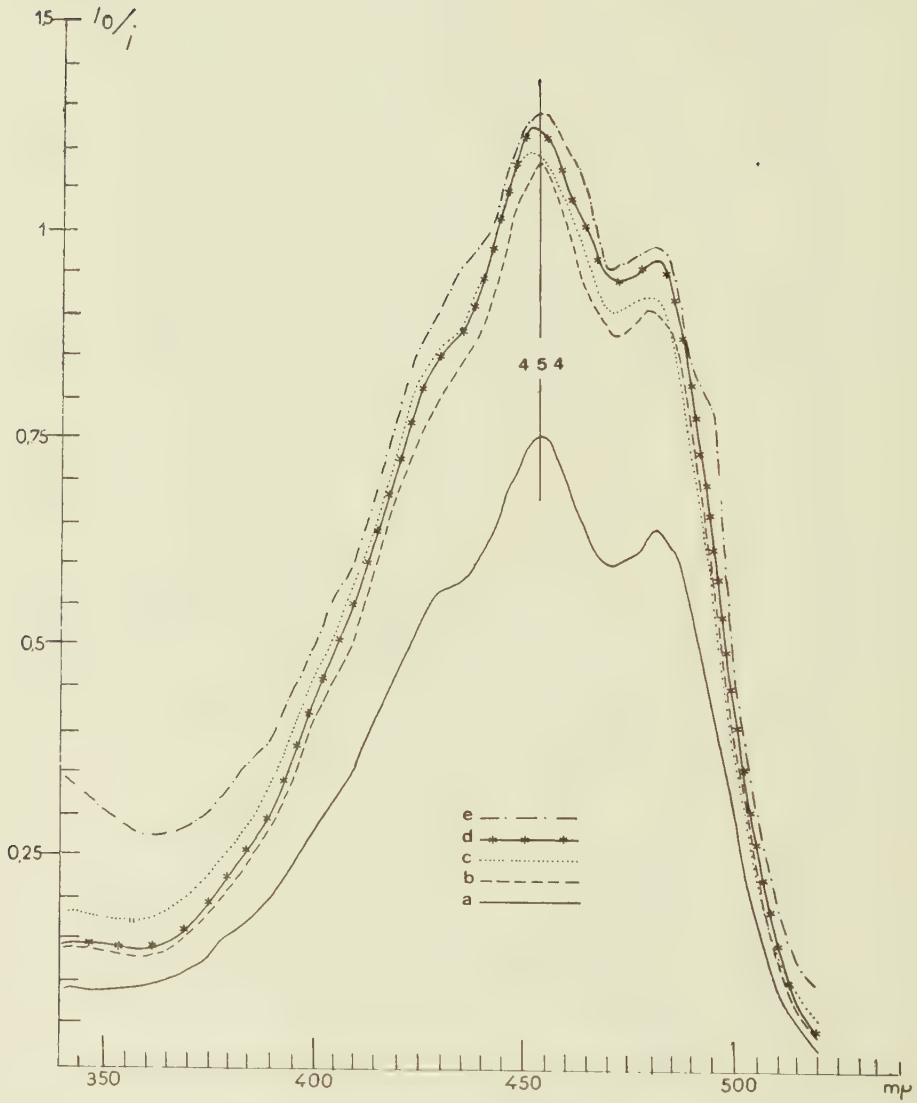


Fig. 20 — Action des radiations sur le β-carotène : exposition aux neutrons; courbes d'absorption du β-carotène en solution dans le cyclohexane :

a) spectre initial
b) après 4 minutes d'irradiation
c) après 10 minutes d'irradiation
d) après 14 minutes d'irradiation
e) après 18 minutes d'irradiation.

Après description de l'appareillage utilisé, nous rapporterons les résultats préliminaires sur ces deux caroténoïdes avant de décrire en détail l'expérimentation sur l'astaxanthine.

Protocole expérimental.

1°) Source de rayonnement (*).

Les radiations émises par le cobalt 60 sont monoénergétiques et leur absorption est due uniquement à l'effet Compton. La source de 20 mm de diamètre est enfoncée dans une lourde tête de plomb ; l'appareil est muni de diaphragmes en tungstène réglables donnant des champs de toutes formes et de toutes dimensions et d'un obturateur en uranium (Fig. 21, p. 96).

La distance d'utilisation dépend de la puissance de la source et varie de 50 à 100 cm. Les têtes sont étudiées pour recevoir des sources allant de 500 à 3000 curies.

Nous avons utilisé pour des raisons de commodité et de temps une distance de 50 cm, inférieure à celle utilisée habituellement en clinique. (Fig. 21, p. 96).

La position des tubes était telle qu'ils ne se sont trouvés, dans aucun cas, dans la pénombre et ils ont tous reçu la même intensité. Nous pouvons rappeler que la radiation γ du cobalt est un phénomène vibratoire électromagnétique qui, comme la lumière, décroît selon l'inverse du carré de la distance. Nos expériences ayant duré plus de quatre mois, nous avons dû tenir compte de la décroissance de l'activité du radiocobalt et effectuer les corrections nécessaires pour évaluer les doses.

(*) La source de rayonnement γ utilisée a été le cobalt 60. La bombe au cobalt est celle du Centre Pierre et Marie Curie d'Alger, dont les caractéristiques sont les suivantes : source de 1516 curies lors de son installation le 1-6-61 ; 975 curies au début de notre expérimentation ; énergie de radiation de 1.200.000 eV ; activité spécifique de 30 curies-gramme

Pour les possibilités de travail qu'ils nous ont offertes, nous tenons à exprimer notre sincère gratitude à M. le Professeur BREHANT, Directeur du Centre Anti-Cancéreux et à M. le Docteur BERNADAC, Chargé de Cours à la Faculté de Médecine de Bordeaux, Chef de Service au Laboratoire des Isotopes au Centre Pierre et Marie Curie.

Nous avons calculé la dose d'exposition dans l'air en rœntgens, au centre de la hauteur du liquide contenu dans les tubes, en nous basant uniquement sur les données fournies par le constructeur (en fonction de la source, de la dimension du champ et surtout de la distance focale). Il ne nous a pas été possible de mesurer d'une façon précise la dose absorbée par défaut du matériel adéquat ; cependant nos conditions de travail étaient reproductibles, car nous avions pour coordonnées une irradiation physiquement précisée (rayonnement γ du radiocobalt) et une durée d'exposition chiffrable en minutes.

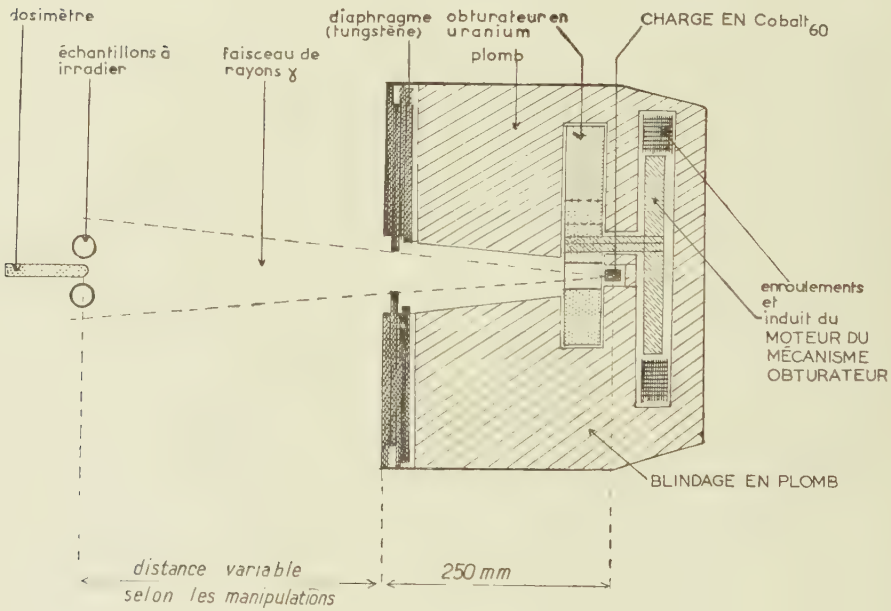


Fig. 21. — Coupe schématique de la tête de la bombe au cobalt 60

Du fait de la faible hauteur du liquide contenu dans nos tubes (15 ml), nous pouvons dire, d'une façon approximative, que la dose absorbée correspond à celle qui atteint le centre du liquide, la partie supérieure ayant reçu une dose plus faible.

D'ailleurs, des expériences effectuées en utilisant un rayonnement perpendiculaire à l'axe du tube nous ont donné des résultats comparables.

Or, il convient de rappeler en y insistant que notre but n'était pas de mesurer de façon précise les doses nécessaires à une réaction chimique, mais de rechercher quelle pouvait être sur des solutions de caroténoïdes l'action qualitative du rayonnement γ.

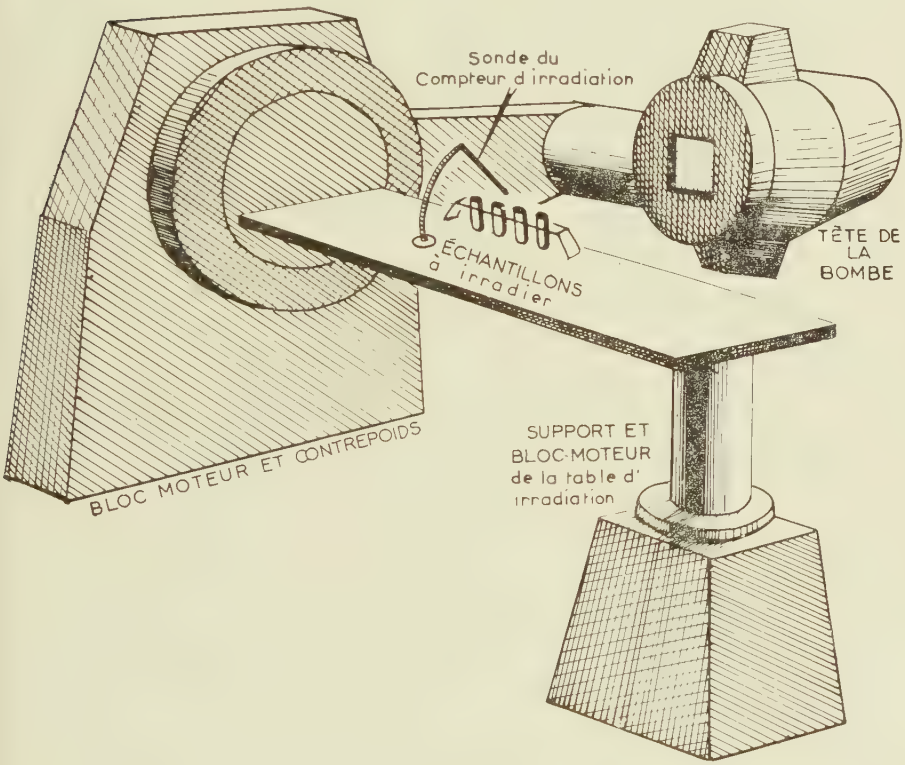


Fig. 22. — Disposition des échantillons pour irradiation par rayons γ (bombe au cobalt Massiot).

Nos tubes étaient situés à 50 cm du focaliseur (35 cm entre la source et l'extrémité inférieure du focaliseur + 15 cm entre le focaliseur et le centre du tube).

2°) préparation des solutions et irradiation.

Comme dans l'expérience précédente, nous avons utilisé comme solvant le cyclohexane, le β-carotène et la xanthophylle étant dissous à la concentration de 3γ p. ml.

Nous avons expérimenté sur des volumes de 15 ml placés dans des tubes en cellulose de 24 mm de diamètre , 1 mm d'épaisseur et 85 mm de hauteur munis de bouchons en matière plastique.

A 50 cm du focaliseur, nous avions 3448 rœntgens-heure ; en effet la bombe débitait à 1 mètre, lors de notre expérimentation, 900 rœntgens-heure.

La décroissance du cobalt étant de 0,9579 en 120 jours, nous avions :

$0{,}9579 \times 900 = 862$ rœntgens-heure à 1 mètre.

Les radiations γ variant en fonction du carré de la distance par rapport à la source, on a donc à 50 cm :

$$\frac{862}{(0{,}50)^2} = 3448 \text{ rœntgens-heure}$$

soit 57,47 rœntgens-minute.

Ainsi, par exemple, pour avoir une irradiation de 1.000 rœntgens, le temps d'exposition aux radiations doit être :

$$\frac{1000}{57} = 17 \text{ minutes } 40/100$$

Le dispositif expérimental (Fig. 22 p. 97) nous a permis d'irradier simultanément trois tubes, contenant respectivement la solution de β-carotène, la solution de xanthophylle et le solvant pur.

Les doses de rayonnement ont été dans les expériences successives de 400, 600, 800 et 1000 roentgens, ce qui correspond à des temps d'irradiation de 6 minutes 96/100, 10 minutes 44/100, 13 minutes 92/100 et 17 minutes 40/100.

Les solutions de β-carotène utilisées possédaient toutes, avant irradiation, deux maxima d'absorption l'un à 454 mμ et l'autre à 482 mμ dans le cyclohexane au spectrophotomètre

Fig. 23. — Action des radiations sur le β-carotène : rayonnement γ ; courbes d'absorption du β-carotène en solution dans le cyclohexane :

a) spectre initial
b) sous l'action des rayons γ : 400 rœntgens
c) sous l'action des rayons γ : 600 rœntgens
d) sous l'action des rayons γ : 800 rœntgens
e) sous l'action des rayons γ : 1000 roentgens

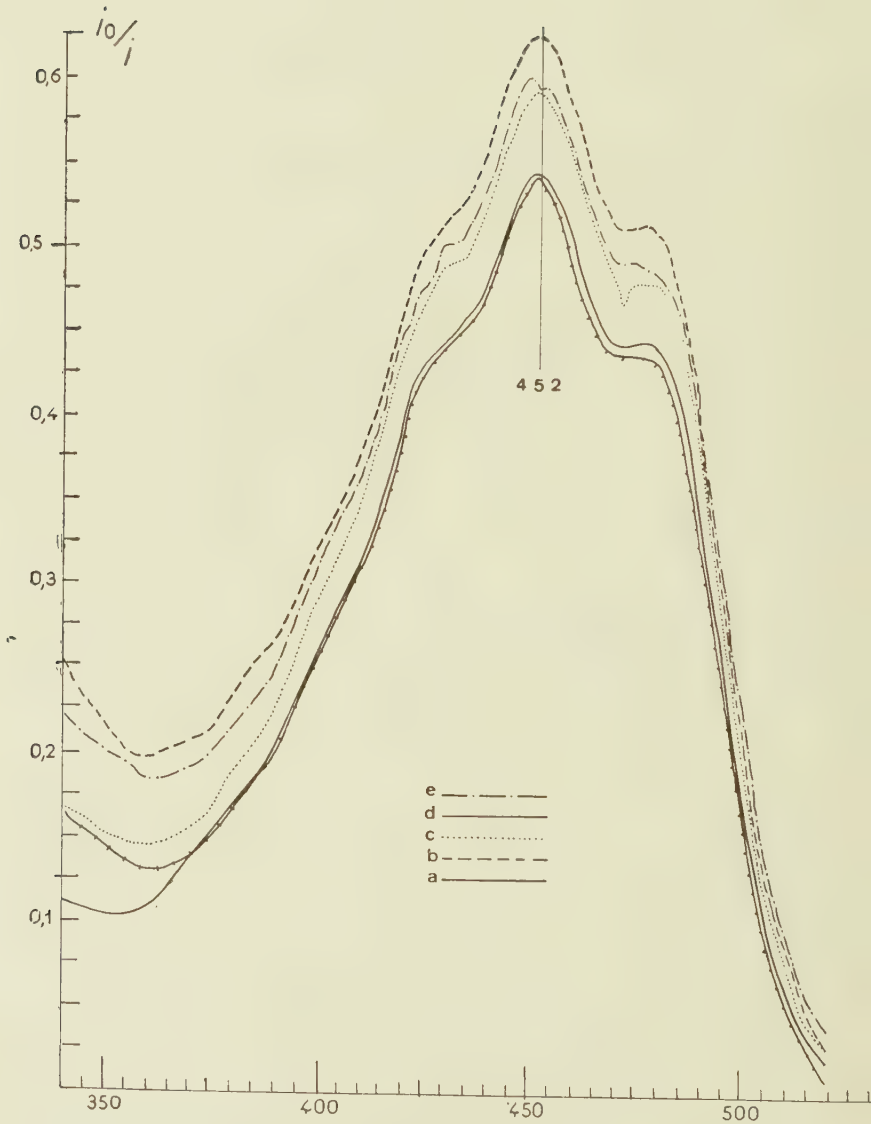


Fig. 24. — Action des radiations sur la xanthophylle : rayonnement γ ; courbes d'absorption de la xanthophylle en solution dans le cyclohexane.

Beckman, modèle DU. Les solutions de xanthophylle utilisées présentaient avant irradiation deux maxima d'absorption l'un à 452 mμ l'autre à 476 mμ dans le cyclohexane.

3°) Etude spectrophotomètrique.

Les enregistrements spectrophotométriques des solutions avant et après irradiation sont objectivés sur les Fig. 23 et 24, p. 99 et 100. La lecture de ce graphique montre que, sous l'action du rayonnement γ, le phénomène d'augmentation de la densité optique, observé après action des neutrons (Fig. 20, p. 94), est retrouvé pour le β-carotène et se manifeste avec la xanthophylle. La confrontation de l'ensemble des résultats permet en outre de constater une sorte de périodicité dans l'intensité du phénomène en fonction de l'irradiation.

Mais de plus, cette nouvelle série d'expériences fait apparaître que, sous l'action du rayonnement γ, se sont produites des modifications intramoléculaires objectivées par de légères, mais indiscutables déformations du spectre d'absorption (Fig. 23 et 24 p. 99 et 100) : étalement des sommets, déplacement vers les courtes longueurs d'onde. Ces déformations sont caractéristiques de la production de stéréoisomères. Ce même phénomène se retrouve d'ailleurs avec plus de netteté encore dans l'expérimentation sur l'astaxanthine qui va être maintenant rapportée en détail.

C) Action du rayonnement γ sur l'astaxanthine.

Le même protocole que pour l'expérimentation, sur l'action du rayonnement γ sur le β-carotène et la xanthophylle, a été adopté (p. 87). Les solutions épiphasiques d'astaxanthine ont été préparées selon la méthode antérieurement décrite (p. 66) mais, pour raison d'homogénéité, c'est en solution dans le cyclohexane et non dans l'éther de pétrole que le pigment a été irradié. De très nombreux essais ont été effectués, les doses variant de 100 à 1250 rœntgens ; nous ne rapporterons ici que les résultats des expériences effectuées avec les mêmes doses que dans les expériences sur le β-carotène et la xanthophylle, aucun fait particulier n'ayant émergé des autres essais.

Comme dans les expériences antérieures, les modifications spectrales enregistrées ne sauraient ê tre imputées à une évaporation partielle des solutions irradiées ; celles-ci étant dans des récipients clos et n'ayant subi, ainsi que nous l'avons vérifié, aucune variation appréciable de température (*).

1°) Etude des modifications spectrales :

Les solutions d'astaxanthine entièrement «trans» possédaient toutes, avant irradiation, un maximum à 468 mμ dans le cyclohexane. L'examen des enregistrements spectrophotométriques révèle ici encore les mêmes phénomènes que ceux observés avec le β-carotène et la xanthophylle et, en premier lieu, un accroissement de la densité optique traduisant l'augmentation des niveaux de même énergie dans le chromophore.

Il convient cependant de remarquer que, dans certains cas, (600 et 800 rœntgens, Fig. 25, p. 103), la densité optique est au contraire diminuée ce qui paraît bien indiquer l'intervention de deux mécanismes antagonistes : en même temps que le rayonnement provoque une activation moléculaire, il produit également des altérations responsables alors de cette diminution ; celle-ci s'accompagne d'ailleurs d'un spectre révélateur de l'apparition de formes stéréoisomères.

2°) Analyse chromatographique des solutions irradiées :

Chacune des solutions irradiées a été soumise à la résolution chromatographique selon les techniques habituelles. Comme il fallait s'y attendre, d'après l'allure des courbes, le chromatogramme a révélé pour chacune des solutions une hétérogénéité pigmentaire. Des doses de 600 à 800 rœntgens conduisent à des résultats particulièrement démonstratifs à cet égard (p. 104). Chacune des zones du chromatogramme a été isolée comme dans les expériences antérieures après élu-

(*) Il convient de mentionner ici que les analyses spectrophotométriques du solvant irradié n'ont révélé aucune altération susceptible, à quelque degré que ce soit d'interférer avec les modifications spectrales imputables aux déformations moléculaires des pigments.

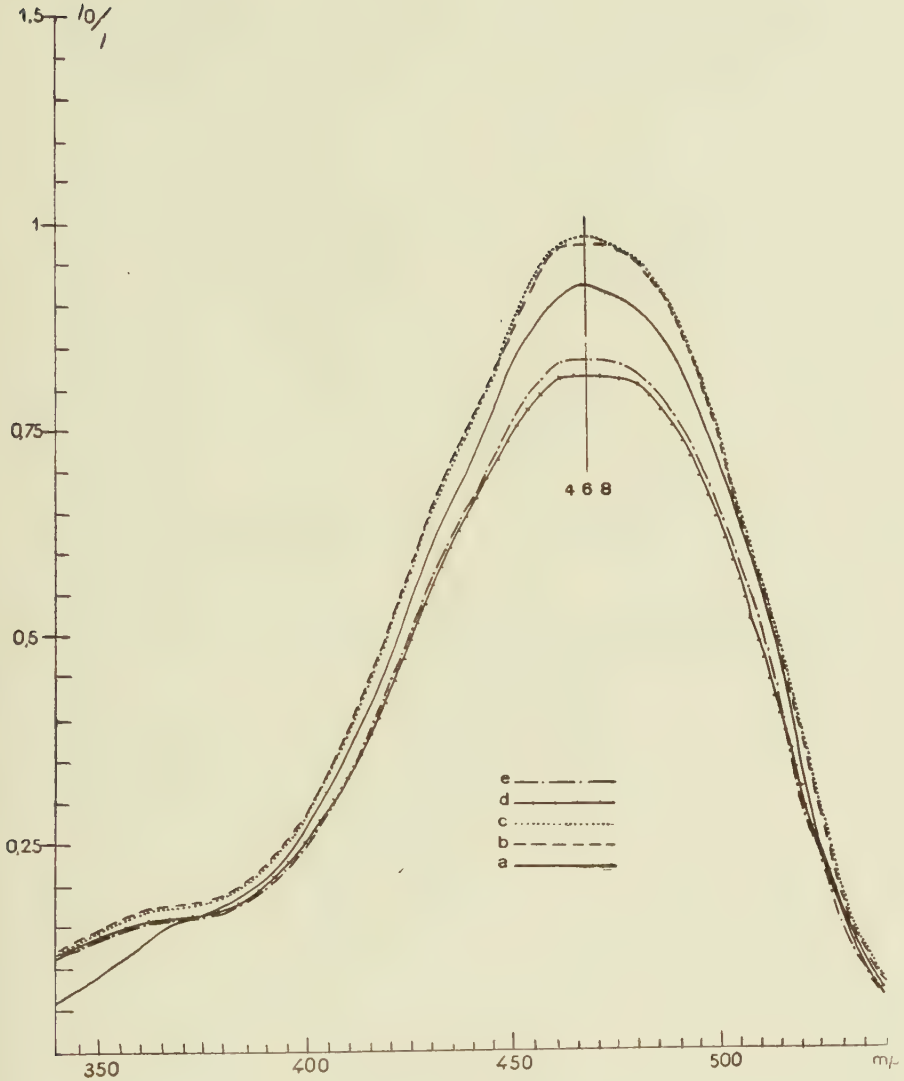


Fig. 25. Action des radiations sur l'astaxanthine : rayonnement γ ; courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans le cyclohexane :

a) spectre initial
b) sous l'action des rayons γ : 400 rœntgens
c) sous l'action des rayons γ : 600 rœntgens
d) sous l'action des rayons γ : 800 rœntgens
e) sous l'action des rayons γ : 1000 rœntgens

tion. Le spectre en a été enregistré ; on a ainsi individualisé des pigments néoformés caractérisés par leur maximum d'absorption situés respectivement à 466, 462 et 458 mμ (Fig. 26).

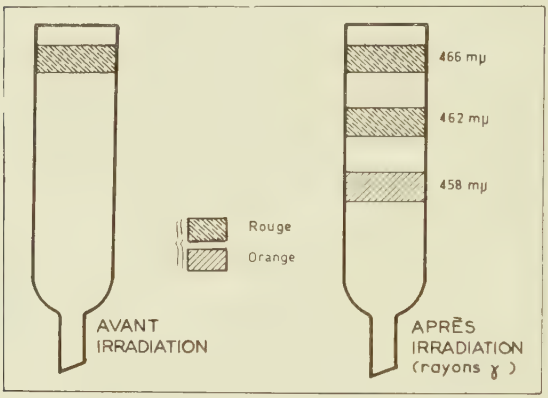


Fig. 26. — Chromatographie du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans le cyclo-hexane.

a) spectre initial
b) sous l'action des rayons γ : 200 rœntgens
c) sous l'action des rayons γ : 400 rœntgens
d) sous l'action des rayons γ : 600 rœntgens
e) sous l'action des rayons γ : 800 rœntgens

CHAPITRE III

Confrontation de l'ensemble des résultats et discussion générale

Dans la première partie de notre travail au cours de l'étude critique qui a été faite de l'ensemble des recherches effectuées sur l'isomérie «cis-trans» des caroténoïdes, nous avons indiqué, pour chaque cas particulier, les modifications des propriétés physiques qui accompagnent la transformation d'un isomère géomètrique en un autre. La confrontation de l'ensemble de ces travaux permet de constater que les modifications observées sont toujours étroitement apparentées : toujours en effet on enregistre, lorsqu'on passe de la forme entièrement «trans» aux formes «mono» et «poly-cis», un abaissement du coefficient d'extinction et un étalement du spectre d'absorption. Cet étalement s'accompagne d'un déplacement des maxima vers les courtes longueurs d'ondes, le décalage étant de l'ordre de 5 à 6 mμ pour chaque plicature. En même temps, apparaît souvent un nouveau maximum dans le proche ultra-violet (entre 320 et 360 mμ environ) : c'est le «cis-peak effect» surtout accusé dans les formes «mono-cis» pour lesquelles la plicature de la molécule se situe au niveau de la double liaison centrale.

Parallèlement à ces modifications spectrales, on enregistre des changements dans les caractères d'adsorption : il est ainsi possible de révèler et d'isoler sur colonne de TSWETT les différents isomères. Chacune des formes ainsi séparées peut à son tour subir l'isomérisation et former à nouveau un mélange de tous les isomères : ce caractère de réversion est sans doute le meilleur critère pour affirmer la nature de la transformation.

A la lumière de ces données, il est maintenant possible d'analyser et de discuter l'ensemble des faits qui établissent l'isomérisation «cis-trans» de l'astaxanthine, et démontrent l'existence dans les milieux naturels d'isomères géométriques de ce caroténoïde dont cependant, ainsi qu'il est de règle, la forme entièrement «trans» est la plus répandue.

Les caractères spectroscopiques de l'astaxanthine ont été étudiés par TISCHER *(81)*. Cet auteur a précisé que le pigment présente une bande d'absorption à maximum unique (*) situé

(*) Ce qui est exceptionnel pour les caroténoïdes, dont, en règle générale au contraire, le système chromophore comporte trois maxima. (d'après KARRER et JUCKER (**5**) et GRANGAUD (**77**)).

à 470 mμ dans l'hexane et à 492 mμ dans la pyridine. Cependant le plus souvent dans les extraits bruts d'astaxanthine, la chromatographie révèle l'existence de plusieurs pigments. C'est ce que BURKHARDT, HEILBRON, JACKSON et PARRY *(90)* ont constaté chez Nephrops norvegicus. Il en est de même chez Aristeomorpha foliacea où CHECHAN, GRANGAUD et MASSONET ont séparé de l'huile d'hépatopancréas trois constituants pigmentaires individualisés par leurs maxima d'absorption, qui se situent respectivement vers 470, 482 et 490 mμ (dans la pyridine) *(14)*.

L'étude des spectres d'absorption laissait en outre soupçonner à ces auteurs l'existence probable d'un quatrième constituant, dont le maximum d'absorption se situerait entre 482 et 490 mμ.

La similitude d'allure des différentes courbes, le caractère acide de ces constituants et le fait que tous les trois se transforment en astacine (tétracéto-β-carotène) par oxydation, montrent qu'il ne peut s'agir que de substances chimiquement très voisines : l'hypothèse que ces pigments représentent un nouvel exemple de stéréoisomérie naturelle dans la série des caroténoïdes ne pouvait dès lors être écartée.

Nos expériences démontrent que vis à vis des agents qui provoquent l'isomérisation géométrique des composés polyéniques, l'astaxanthine ne se comporte pas de façon très différente des autres caroténoïdes : le vieillissement spontané des solutions se traduit par un affaiblissement du coefficient d'extinction, un étalement du spectre d'absorption vers les courtes longueurs d'ondes, révèlant ainsi l'apparition des constituants nouveaux que la chromatographie permet de séparer (Tableau III, p. 76).

Entièrement superposables sont les résultats obtenus en accélérant le processus par ébullition à reflux (Tableau III, p. 76) ou par contact avec l'alumine (Tableau V, p. 83). A partir d'un constituant spectroscopiquement et chromatographiquement pur, on obtient un mélange de quatre pigments caractérisés par leurs maxima d'absorption qui se situent respectivement à 492, 488, 482 et 470 mμ (dans la pyridine). La transformation est réversible, puisque chacun de ces pigments est

susceptible d'engendrer tous les autres, ce qui démontre la nature purement physique du phénomène : toute autre interprétation que celle d'une isomérisation géométrique se trouve de ce fait exclue. D'autre part, la similitude des caractères spectraux et du comportement chromatographique démontre l'identité deux à deux des pigments naturels et de ceux obtenus artificiellement.

Les règles énoncées par PAULING conduisent à attribuer une structure «mono-cis», «bis-cis» et «poly-cis» respectivement aux pigments dont les maxima se situent à 488, 482 et 470 mμ (dans la pyridine). Dans ces conditions, on devrait s'attendre à ce que le dérivé «mono-cis» (maximum d'absorption à 488 mμ) présente un «cis-peak» vers 350 mμ. Or, dans aucune de nos expériences, cet accident ne s'est accusé avec intensité. S'il est vrai que souvent a été observée une élévation des absorptions dans la région où le «cis-peak» se manifeste habituellement, cette altération du spectre est toujours restée discrète.

Comment dès lors interpréter cette anomalie ? Faut-il en conclure que le pigment en question n'est pas le dérivé «mono-cis» ? Sans qu'il soit possible d'écarter de façon définitive cette éventualité, il parait plus vraisemblable de s'orienter vers une autre hypothèse :

On peut en premier lieu envisager que la plicature de la molécule ne se fait pas au niveau de la double liaison centrale et que, dans ces conditions, l'édifice moléculaire n'affecte pas la forme d'un V ouvert, requise pour que le «cis-peak» se manifeste.

Mais on ne voit pas à priori pourquoi une molécule aussi symétrique que celle de l'astaxanthine se singulariserait des autres caroténoïdes, pour lesquels en règle très générale c'est la double liaison centrale de la chaîne terpénique qui est le plus sujette à remaniements «cis-trans».

Une seconde hypothèse, qui nous paraît plus séduisante est que le dérivé considéré comme «mono-cis» a bien la forme d'un V ouvert, mais que la nature chimique des groupes oxygénés des noyaux de β-ionone de l'astaxanthine (groupes facilement énolisables) retentit, en les modifiant, sur les phéno-

mènes d'oscillations électroniques qui, dans les dérivés «mono-cis», sont responsables de l'apparition du «cis-peak».

Autrement dit, ce serait la nature chimique de l'astaxanthine qui rendrait compte de la singularité spectrale que manifeste le dérivé «mono-cis» dans le proche ultra-violet, de même que c'est la nature chimique du pigment qui, de toute évidence, le singularise des autres caroténoïdes quant à l'allure générale de sa courbe d'absorption dans la région visible du spectre (maximum unique).

Bien entendu, dans l'état actuel de nos recherches, il ne serait être question de présenter cette interprétation autrement que comme une hypothèse de travail.

Il est assez remarquable de constater que, sous l'action des rayons γ, s'observent des déformations moléculaires semblables à celles obtenues par les procédés classiques, les stéréoisomères obtenus par irradiation de l'astaxanthine entièrement «trans» étant comparables à ceux décrits dans la première partie de notre travail.

Mais à cette action stéréoisomérisante des radiations, se superpose une augmentation du nombre de niveaux de même énergie intramoléculaire, phénomène qui se traduit par un accroissement de la densité optique des solutions, de sorte que, mis à part ce phénomène d'activation, l'action des radiations produit des effets comparables à ceux obtenus par les agents physiques classiquement utilisés pour provoquer l'isomérisation cis-trans artificielle des pigments caroténoïdes.

RESUME ET CONCLUSIONS

L'étude critique de l'ensemble des travaux relatifs à l'isomérie géométrique des caroténoïdes nous a permis de préciser les conditions dans lesquelles peut être provoquée la formation de stéréoisomères.

1°) Il nous a été ainsi possible de retrouver les principaux résultats obtenus par nos devanciers dans leurs recherches sur l'isomérisation «cis-trans» du β-carotène.

2°) Nous avons pu confirmer, ce qui avait été entrevu par GILLAM et EL RIDI, constaté par ZECHMEISTER, puis établi expérimentalement par MEUNIER, JOUANNETEAU et ZWINGELSTEIN, que l'adsorption sur alumine est à elle seule susceptible de provoquer des remaniements «cis-trans» de l'édifice moléculaire des pigments caroténoïdes.

3°) Cette constatation nous a permis d'insister sur le fait que les résultats de la chromatographie, procédé analytique par ailleurs remarquable, doivent être interprétés avec prudence, ainsi que LEDERER l'avait antérieurement fait observer.

4°) L'utilisation des techniques désormais classiques de stéréoisomérisation «cis-trans» des caroténoïdes nous a permis de démontrer que le comportement de l'astaxanthine n'était pas sensiblement différent de celui des autres pigments terpéniques.

5°) Les différents moyens mis en œuvre : action du temps, ébullition à reflux des solutions, adsorption sur alumine conduisent à des résultats superposables et régulièrement reproductibles.

Nous avons ainsi isolé quatre isomères géométriques, que nous avons caractérisés par leurs propriétés spectrales et leur comportement chromatographique.

6°) La transformation aboutit à un équilibre.

7°) A partir de l'une quelconque des formes, on obtient toutes les autres.

8°) L'application des règles de PAULING aux données spectrales de chacun des pigments isolés permettant de proposer respectivement pour chacun d'eux une structure entièrement «trans», (λ max. = 492 mμ dans la pyridine), «mono-cis» (λ max. = 488 mμ), « bis-cis » (λ max. = 482 mμ) et «poly-cis» (λ max. = 470 mμ).

9°) Contrairement à ce que fait prévoir la théorie, le dérivé pour lequel la structure «mono-cis» a été proposée ne présente pas de maximum d'absorption accusé («cis-peak») dans le proche ultra-violet : une hypothèse a été présentée pour rendre compte de cette anomalie.

10°) La comparaison des pigments préparés artificiellement et de ceux isolés des milieux naturels montre qu'ils sont identiques deux à deux : l'astaxanthine offre donc un nouvel exemple de stéréoisomérie spontanée.

11°) Sous l'action des radiations (neutrons et rayons γ) les solutions de pigments caroténoïdes (β-carotène, xanthophylle, astaxanthine) ont leur densité optique qui se modifie ; pour certaines doses, cette densité augmente, pour d'autres, elle diminue, cette variation n'étant pas directement proportionnelle à l'intensité du rayonnement.

12°) Par irradiation à l'aide du rayonnement γ est, en outre, obtenu un phénomène d'isomérisation «cis-trans» objectivé par des modifications spectrales caractéristiques : étalement du sommet principal et déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde.

L'analyse chromatographique qui permet d'isoler les pigments néo-formés confirme les données spectrales.

13°) Les stéréoisomères de l'astaxanthine obtenus après irradiation γ sont comparables à ceux formés par ébullition à reflux, ou le contact prolongé avec l'alumine.

BIBLIOGRAPHIE

(1) ZECHMEISTER L.,
Bull. Soc. Chim. Biol., (1949), **31**, 956.

(2) KUHN R. et WINTERSTEIN A.
Ber., (1933), **66**, 209.

(3) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
J. Biol. Chem., (1942), **144**, 315

(4) ZECHMEISTER L., LE ROSEN A.L., WENT F.W. et PAULING L
Proc. Nat. Acad. Sci., (1941), **27**, 468.

(5) KARRER P. et JUCKER E.
Carotenoids, (1950), Elsevier Ed. New-York

(6) ZECHMEISTER L. et LEMMON R.M.
J. Am. Chem. Soc., (1944), **66**, 317

(7) ZECHMEISTER L. et TUZSON P.
Biochem. J., (1938), **32**, 1305.

(8) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Nature, London, (1935), **136**, 914

(9) MEUNIER P., JOUANNETEAU J. et ZWINGELSTEIN G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1951), **33**, n° 9, 1228.

(10) ZECHMEISTER L., LE ROSEN A.L., SCHROEDER W.A., POLGAR A. et PAULING L
J. Am. Chem. Soc., (1943),**65**, 1940

(11) WALD G. in, SEBRELL W.H. Jr et HARRIS R.S.
« The Vitamins », (1954), Academic Press, **1**, 59

(12) CHARDENOT P.
Thèse Pharm., Alger (1956).

(13) GRANGAUD R. et CHARDENOT P.
C.R. Acad. Sci., (1956), **242**, 1767.

(14) CHECHAN C., GRANGAUD R. et MASSONET R.
C.R. Soc. Biol., (1950), **144**, 1025

(15) KIA-YIN P. et BALISTIC F.
Irradiation des Aliments, SACLAY (1962), **2**, n° 4, A 6.

(16) HERZIG J. et FALTIS F.
Ann., (1923), **431**, 40.

(17) BOUSSINGAULT J.B.
Ann. Chim., (1825), **28**, 440.

(18) KARRER P., HELFENSTEIN A., WIDMER R. et van ITALLIE T.B.
Helv. Chim. Acta, (1929), **12**, 741.

(19) LEDERER E.
Thèse Sci., Paris (1938).

(20) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Ann., (1937), **530**, 291.

(21) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Nature, London, (1938), **141**, 249.

(22) HUBBARD R. et WALD G.
Science, (1952), **114**, 60.

(23) HUBBARD R. et WALD G.
J. Gen. Physiol., (1952-1953), **36**, 269.

(24) CARTER G.P. et GILLAM A.E.
Biochem. J., (1939), **33**, 1326.

(25) ZECHMEISTER L. et TUZSON P.
Ber., (1939), **72**, 1340.

(26) NASH H.A. et ZSCHEILE F.P.
Arch. Biochem., (1944), **5**, 77.

(27) QUACKENBUSH F.W., STEENBOCK H. et PETERSON W.H.
J. Am. Chem. Soc., (1938), **60**, 2937.

(28) STRAIN H.H.
J. Am. Chem. Soc., (1941), **33**, 3448.

(29) STRAIN H.H. et MANNING W.M.
J. Am. Chem. Soc., (1942), **64**, 1235.

(30) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1943), **65**, 1522.

(31) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Biochem. J., (1936), **30**, 1735.

(32) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1942), **64**, 1856.

(33) GILLAM A.E., EL RIDI M.S. et KON S.K.
Biochem. J., (1937), **31**, 1605.

(34) KUHN R. et WINTERSTEIN A.
Ber., (1932), **65**, 646.

(35) KARRER P. et SALOMON H.
Helv. Chim. Acta, (1927), **10**, 397.

(36) KARRER P. et MIKI K.
Helv. Chim. Acta, (1929), **12**, 985.

(37) BEADLE B.W. et ZSCHEILE F.P.
J. Biol. Chem., (1942), **144**, 21.

(38) KEMMERER A.R. et FRAPS G.S.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., (1943), **15**, 714.

(39) DEUEL H.J., JOHNSON E., SUNMER A., POLGAR A. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem., (1944), **5**, 107.

(40) SAVINOV B.G. et MIKAJLOVNINA A.A.
Dokn. Akad. Nauk. S.S.S.R., (1953), **88**, n° 5.

(41) KUHN R. et LEDERER E.
Ber., (1931), **64**, 1349.

(42) KUHN R. et LEDERER E.
Nature, London, (1931), **19**, 306.

(43) KARRER P., HELFENSTEIN A., WEHRLI H., PIEPER B. et MORF R.
Helv. Chim. Acta, (1931), **14**, 614.

(44) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1944), **66**, 137.

(45) BRACONNOT H.
Ann. Chim., (1817), **2**, 122.

(46) THUDICUM J.W.L.
Proc. Roy. Soc., London, (1869), **17**, 253.

(47) PALST T.
Arch. Pharm., (1892), **230**, 108.

(48) DUGAR B.M.
Washington Univ. Studies Sci. et Tech., (1913), **I.**

(49) MONTEVERDE N.A. et LYUBIMENKO V.N.
Bull. Acad. Imp. Sci., St Petersburg, (1912), **VI**, 609.

(50) TSCHIRCH A.
Ben. Dent. Botan. Ges., (1904), **22**, 414.

(51) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1937), **530**, 291.

(52) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann. (1935), **516**, 30.

(53) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1936), **523**, 101.

(54) ZECHMEISTER L. et PINCKARD J.H.
J. Am. Chem. Soc., (1947), **69**, 1930.

(55) STRAIN H.H.
J. Biol. Chem., (1938), **127**, 191.

(56) ZECHMEISTER L., VON CHOLNOKY L. et POLGAR A.
Ber., (1939), **72**, 1678.

(57) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1940), **543**, 248.

(58) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1945), **67**, 108.

(59) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
J. Am. Chem. Soc., (1942), **64**, 1173.

(60) ZECHMEISTER L. et ESCUE R.R.
J. Biol. Chem., (1942), **144**, 321.

(61) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
Arch. Biochem., (1942), **1**, 231.

(62) LE ROSEN A.L. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem., (1942), **1**, 17.

(63) KUHN R. et GRUNDMANN C.
Ber., (1934), **67**, 339.

(64) LEDERER E.
C.R. Acad. Sci., (1934), **197**, 1694.

(65) SCHON K.
Biochem. J., (1938), **32**, 1566.

(66) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
J. Am. Chem. Soc., (1943), **65**, 1535.

(67) POLGAR A., VAN NIEL C.B. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem., (1944), **5**, 243.

(68) VAN NIEL C.B. et SMITH J.H.C.
Arch. Mikrobiol., (1935), **6**, 219.

(69) KARRER P., MORF R. et SCHOPP K.
Helv. Chim Acta, (1931), **14**, 1306.

(70) ROBESON C.D. et BAXTER J.G.
J. Am. Chem. Soc., (1947), **69**, 136.

(71) MEUNIER P. et JOUANNETEAU J.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1948), **30**, 260.

(72) BALL S., GOODWIN T.W. et MORTON R.A.
Biochem. J., (1948), **42**, 516.

(73) HUBBARD R., GREGERMAN R.I. et WALD G.
J. Gen. Physiol., (1952-1953), **36**, 189.

(74) WALD G.
Exptl. Cell Research., (1958), suppl. **5**, 389.

(75) BROCKMANN H. et SCHODDER H.
Ber., (1941), **74**, 73.

(76) NICOL M.
Thèse Méd., Alger (1956).

(77) GRANGAUD R.
Actualités biochimiques, (1951), MASSON Ed. PARIS, **15**, 23.

(78) GRANGAUD R. et MASSONET R.
C.R. Acad. Sci., (1948), **227**, 568.

(79) KUHN R. et SORENSEN N.A.
Ber., (1938), **71**, 1879.

(80) WALD G
Vitamins and Hormones, (1943), **I**, 195.

(81) TISCHER J.
Z. Physiol. Chem., (1936), **239**, 257.

(82) BONET-MAURY P.
Bull. Soc. Chim. Fr., (1951), **79**, 333.

(83) ALLEN A.O.
Rad. Research., (1952), **1**, 85.

(84) DAINTON F.S. et COLLINSON E.
Ann. Rev. Phys. Chem., (1951), **2**, 99.

(85) PATTI F.
Thèse Sci., Paris (1959).

(86) CHAPIRO A., MAGAT M., PREVOT-BERNAS A. et SEBBAN J.
J. Chim. Phys., (1955), **52**, 689.

(87) LANDLER I.
Thèse Sci., Paris (1952).

(88) COTTIN M.
J. Chim. Phys., (1956), **53**, 903.

(89) HAISSINSKY M.
Actions Chimiques et Biologiques des Radiations (1955).
(1955), MASSON Ed., Paris, 1re Série, VII.

(90) BURKHARDT G.N., HEILBRON I.M., JACKSON H. et PARRY E.G.
Biochem. J., (1934), **28**, 1698.

(91) GOODWIN T.W.
The Comparative Biochemistry of the Carotenoids (1952)
Chapman et Hall Ed., London.

INDEX ALPHABETIQUE DES AUTEURS

(83) ALLEN A.O.
Rad. Research, (1952) **1**, 85.

(72) BALL S., GOODWIN T.W. et MORTON R.A.
Biochem. J., (1948), **42**, 516.

(37) BEADLE B.W. et ZSCHEILE F.P.
J. Biol. Chem., (1942), **144**, 21.

(82) BONET-MAURY P.
Bull. Soc. Chim. Fr., (1951), **79**, 333.

(17) BOUSSINGAULT J.B.
Ann. Chim., (1825), **28**, 440.

(45) BRACONNOT H.
Ann. Chim., (1817), **2**, 122..

(75) BROCKMANN H. et SCHODDER H.
Ber., (1941), **74**, 73.

(90) BURKHARDT G.N., HEILBRON H., JACKSON H. et PARRY E.G.
Biochem. J., (1934), **28**, 1698.

(24) CARTER G.P. et GILLAM A.E.
Biochem. J., (1939), **33**, 1326.

(86) CHAPIRO A., MAGAT M., PREVOT-BERNAS A. et SEBBAN J.
J. Chim. Phys., (1955), **52**, 689.

(12) CHARDENOT P.
Thèse Pharm., Alger, (1956).

(14) CHECHAN C., GRANGAUD R. et MASSONET R.
C.R. Soc. Biol., (1950), **144**, 1025.

(88) COTTIN M.
J. Chim. Phys., (1956), **53**, 903.

(84) DAINTON F.S. et COLLINSON E.
Ann. Rev. Phys. Chem., (1951), **2**, 99.

(39) DEUEL H.J., JOHNSTON E., SUNMER A., POLGAR A. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem., (1944), **5**, 107.

(48) DUGAR B.M.
Washington Univ. Studies Sci. et Tech., (1913), **I**

(8) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Nature, London (1935), **136**, 914.

(31) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Biochem. J., (1936), **30**, 1735.

(20) GILLAM A.E. et EL RIDI M. S.
Ann., (1937), **530**, 291.

(33) GILLAM A.E., EL RIDI M.S. et KON S.K.
Biochem. J., (1937), **31**, 1605.

(21) GILLAM A.E. et EL RIDI M.S.
Nature, London, (1938), **141**, 249.

(91) GOODWIN T.W.
The Comparative Biochemistry of the Carotenoids (1952).
Chapman et Hall. Ed. London.

(77) GRANGAUD R.
Actualités Biochimiques, (1951), **15**, 23.
Masson Ed., Paris.

(13) GRANGAUD R. et CHARDENOT P.
C.R. Acad. Sci., (1956), **242**, 1767.

(78) GRANGAUD R. et MASSONET R.
C.R. Acad. Sci., (1948), **227**, 568.

(89) HAISSINSKY M.
Actions Chimiques et Biologiques des Radiations, (1955),
1re Série, VII, Masson Ed., Paris.

(16) HERZIG J. et FALTIS F.
Ann., (1923), **431**, 40.

(73) HUBBARD R., GREGERMAN R.I. et WALD G.
J. Gen. Physiol., (1952-1953), **36**, 189.

(22) HUBBARD R. et WALD G.
Science, (1952), **114**, 60.

(23) HUBBARD R. et WALD G.
J. Gen. Physiol., (1952-1953), **36**, 269.

(43) KARRER P., HELFENSTEIN A., WEHRLI H., PIEPER B. et MORF R.
Helv. Chim. Acta, (1931), **14**, 614.

(18) KARRER P., HELFENSTEIN A., WIDMER R. et van ITALLIE T.B.
Helv. Chim. Acta, (1929), **12**, 741.

(5) KARRER P. et JUCKER E.
Carotenoids, (1950).
Elsevier Ed. New-York.

(36) KARRER P. et MIKI K.
Helv. Chim. Acta, (1929), **12**, 985.

(69) KARRER P., MORF R. et SCHOPP K.
Helv. Chim. Acta, (1931), **14**, 1306.

(35) KARRER P. et SALOMON H.
Helv. Chim., Acta, (1927), **10**, 397.

(38) KEMMERER A.R. et FRAPS G.S.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., (1943), **15**, 714.

(15) KIA-YIN P. et BALISTIC F.
Irradiation des Aliments, SACLAY (1962), **2**, n° 4, A 6.

(63) KUHN R. et GRUNDMANN C.
Ber., (1934), **67**, 339.

(42) KUHN R. et LEDERER E.
Nature, London, (1931), **19**, 306.

(41) KUHN R. et LEDERER E.
Ber., (1931), **64**, 1349.

(79) KUHN R. et SORENSEN N.A.
Ber., (1938), **71**, 1879.

(34) KUHN R. et WINTERSTEIN A.
Ber., (1932), **65**, 646.

(2) KUHN R. et WINTERSTEIN A.
Ber., (1933), **66**, 209.

(87) LANDLER I.
Thèse Sci., Paris, (1952).

(64) LEDERER E.
C.R. Acad. Sci., (1934), **197**, 1694.

(19) LEDERER E.
Thèse Sci., Paris, (1938).

(62) LE ROSEN A. L. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem., (1942), **I**, 17.

(71) MEUNIER P. et JOUANNETEAU J.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1948), **30**, 260.

(9) MEUNIER P., JOUANNETEAU J. et ZWINGELSTEIN G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1951), **33**, n° 9, 1228.

(49) MONTEVERDE N.A. et LYUBIMENKO V.N.
Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg, (1912), **6**, 609.

(26) NASH H.A. et ZSCHEILE F.P.
Arch. Biochem., (1944), **5**, 77.

(76) NICOL M.
Thèse Méd., Alger, (1956).

(47) PALST T.
Arch. Pharm., (1892), **230**, 108.

(85) PATTI F
Thèse Sci., Paris, (1959).

(67) POLGAR A., VAN NIEL C.B. et ZECHMEISTER L.
Arch. Biochem., (1944), **5**, 243.

(27) QUACKENBUSH F.W., STEENBOCK H. et PETERSON W.H.
J. Am. Chem. Soc., (1938), **60**, 2937.

(70) ROBESON C.D. et BAXTER J.G.
J. Am. Chem. Soc., (1947), **69**, 136.

(40) SAVINOV B.G. et MIKAJLOVNINA A.A.
Dokn. Akad. Nauk. S.S.S.R. (1953), **88**, n° 5.

(65) SCHON K.
Biochem. J., (1938), **32**, 1566.

(55) STRAIN H.H.
J. Biol. Chem., (1938), **127**, 191.

(28) STRAIN H.H.
J. Am. Chem. Soc., (1941), **33**, 3448.

(29) STRAIN H.H. et MANNING W.M.
J. Am. Chem. Soc., (1942), **64**, 1235.

(81) TISCHER J.
Z. Physiol. Chem., (1936), **239**, 257.

(46) THUDICUM J.W.L.
Proc. Roy. Soc. Londres, (1869), **17**, 253.

(50) TSCHIRCH A
Ben. Dent. Botan. Ges., (1904), **22**, 414.

(68) VAN NIEL C.B. et SMITH J.H.C.
Arch. Mikrobiol., (1935), **6**, 219.

(80) WALD G.
Vitamins and Hormones, (1943), **I**, 195.

(11) WALD G.
in SEBRELL W.H. Jr et HARRIS R.S.
« The Vitamins », (1954), **1**, 59 Academic Press New-York

(74) WALD G.
Exptl. Cell. Research., (1958), suppl. **5**, 389.

(1) ZECHMEISTER L.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1949), **31**, 956.

(60) ZECHMEISTER L. et ESCUE R.R.
J. Biol. Chem. (1942), **144**, 321.

(6) ZECHMEISTER L. et LEMMON R.M.
J. Am. Chem. Soc., (1944), **66**, 317.

(10) ZECHMEISTER L., LE ROSEN A.L., SCHROEDER W.A., POLGAR A. et PAULING L.
J. Am. Chem. Soc., (1943), **65**, 1940.

(4) ZECHMEISTER L., LE ROSEN A.L., WENT F.W. et PAULING L.
Proc. Nat. Acad. Sci., (1941), **27**, 468.

(54) ZECHMEISTER L. et PINCKARD J.H.
J. Am. Chem. Soc., (1947), **69**, 1930.

(32) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1942), **64**, 1856.

(30) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1943), **65**, 1522

(44) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1944), **66**, 137.

(58) ZECHMEISTER L. et POLGAR A.
J. Am. Chem. Soc., (1945), **67**, 108.

(61) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
Arch. Biochem., (1942), **I**, 231.

(59) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
J. Am. Chem. Soc., (1942), **64**, 1173.

(3) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
J. Biol. Chem., (1942), **144**, 315.

(66) ZECHMEISTER L. et SCHROEDER W.A.
J. Am. Chem. Soc., (1943), **65**, 1535.

(7) ZECHMEISTER L. et TUZSON P.
Biochem. J., (1938), **32**, 1305.

(25) ZECHMEISTER L. et TUZSON P.
Ber., (1939), **72**, 1340.

(52) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1935), **516**, 30.

(53) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1936), **523**, 101.

(51) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1937), **530**, 291.

(56) ZECHMEISTER L., VON CHOLNOKY L. et POLGAR A.
Ber., (1939), **72**, 1678.

(57) ZECHMEISTER L. et VON CHOLNOKY L.
Ann., (1940), **543**, 248.

TABLE DES FIGURES

Fig. 1. Formules développées de pigments caroténoïdes naturels 33

Fig. 2. Formules développées de pigments caroténoïdes naturels 39

Fig. 3. Stéréoisomères du lycopène 41

Fig. 4. Formules développées de pigments caroténoïdes naturels 46

Fig. 5 Stuctures de quatre isomères géométriques de la vitamine A 51

Fig. 6 Courbes d'absorption du β-carotène en solution dans éther de pétrole + benzène; avant et après ébullition 63

Fig. 7. Chromatographie du β-carotène en solution dans éther de pétrole + benzène; avant et après ébullition 64

Fig. 8. Formules de l'astaxanthine 67

Fig. 9 Courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'éther de pétrole; avant et après ébullition 69

Fig. 10. Chromatogaphies du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans éther de pétrole + benzène; avant et après ébullition 70

Fig. 11. Courbes d'absorption du pigment hypophasique en solution dans éther de pétrole + benzène; avant et après ébullition 72

Fig. 12. Chromatographies du pigment hypophasique de l'astaxanthine en solution dans éther de pétrole + benzène; avant et après ébullition 73

Fig. 13. Courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'hexane; avant et après ébullition 75

Fig. 14. Courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'éther de pétrole; avant et après transformation en fonction du temps (20 jours) 78

Fig. 15. Courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'hexane ; avant et après transformation en fonction du temps (9 jours) 79

Fig. 16. Chromatographies du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans l'éther de pétrole avant et après transformation par adsorption sur alumine.. 81

Fig. 17 Vue latérale schématique de l'accélérateur d'ions SAMES 88

Fig. 18. Principe du fonctionnement de l'accélérateur d'ions SAMES 89

Fig. 19. Schéma du montage pour irradiation par neutrons 91

Fig. 20 Courbes d'absorption de la solution de β-carotène en solution dans le cyclohexane ; avant et après exposition aux neutrons 94

Fig. 21. Coupe schématique de la tête de la bombe au cobalt 60 96

Fig. 22. Disposition des échantillons pour irradiation par rayons γ (bombe au cobalt 60 Massiot) 97

Fig. 23. Courbes d'absorption du β-carotène en solution dans le cyclohexane ; avant et après irradiation par rayons γ 99

Fig. 24. Courbes d'absorption de la xanthophylle en solution dans le cyclohexane ; avant et après irradiation par rayons γ 100

Fig. 25. Courbes d'absorption du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans le cyclohexane ; avant et après irradiation par rayons γ 103

Fig. 26. Chromatographies du pigment épiphasique de l'astaxanthine en solution dans le cyclohexane; avant et après irradiation par rayons γ 104

TABLE DES MATIERES

PREFACE 11

INTRODUCTION 17

PREMIERE PARTIE

ETUDE HISTORIQUE ET CRITIQUE DES TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I. — Facteurs susceptibles de provoquer l'isomérisation « cis-trans » des caroténoïdes et techniques mises en œuvre 23

CHAPITRE II. — Formes « mono et poly-cis » naturelles et artificielles des caroténoïdes 29

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE

CHAPITRE I. — Isomérisation du β-carotène et de l'astaxanthine sous l'action de la température, du temps et par adsorption sur alumine 59

CHAPITRE II. — Action des radiations sur le β-carotène, la xanthophylle et l'astaxanthine 85

CHAPITRE III. — Confrontation de l'ensemble des résultats et discussion générale 105

RESUME ET CONCLUSIONS 111

BIBLIOGRAPHIE 115

INDEX ALPHABETIQUE DES AUTEURS 123

TABLE DES FIGURES 131

TABLE DES MATIERES 135

Vu :
Le Président de Thèse,
Signé : GRANGAUD.

Vu :
Le Doyen,
Signé : LEROY

N° 187/AM
Vu et permis d'imprimer
Rennes, le 21 Janvier 1965
Le Recteur,
Signé : LE MOAL

DEUXIEME THESE

(Propositions données par la Faculté)

LES HAPTOGLOBINES

IMPRIMERIE NORD-AFRICAINE
8, rue Drouillet — ALGER